

AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN
MIT DER DNS-VORLÄUFERSUBSTANZ
 H^3 -THYMIDIN
BEI DER ENTWICKLUNG
SUBKUTANER IMPLANTATE
DES EHRlich-MÄUSE-ASZITES-TUMORS

Herbert Heinrich Muth

1965

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. BÜNGELER

AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN
MIT DER DNS-VORLÄUFERSUBSTANZ
 H^3 -THYMIDIN
BEI DER ENTWICKLUNG
SUBKUTANER IMPLANTATE
DES EHRlich-MÄUSE-ASZITES-TUMORS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Herbert Heinrich Muth
aus Saalfeld/Saale

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. M. EDER
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. BÜNGELER
Dekan:	Prof. Dr. R. ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 11. 1965



MEINER MUTTER GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	7
UNTERSUCHUNGSGUT UND METHODIK	9
VERSUCHSERGEBNISSE UND BESPRECHUNGEN	
I. Untersuchungen an Tumorzellimplantaten nach vorheriger Markierung	11
II. Untersuchungen an einstündig markierten subkutanen Implantaten und Tumorasziteszellen	23
ZUSAMMENFASSUNG	39
LITERATUR	41

EINLEITUNG

In der experimentellen Geschwulstforschung haben die Impfgeschwülste besondere Bedeutung erlangt, obwohl sie nicht ohne weiteres mit den menschlichen Geschwülsten vergleichbar sind. Die besondere Bedeutung liegt einerseits darin, dass sich durch die Impfgeschwulst eine genetisch einheitliche Geschwulst transplantieren und wegen der Transplantabilität besonders günstig untersuchen lässt. Andererseits stellt aber das Wachstum der in Einzelzellen transplantierten Geschwulst insofern eine Analogie zum Geschwulstproblem des Menschen dar, als die Metastasierung von in Blut- oder Lymphbahnen eingebrochenen Tumoren von Einzelzellen ausgeht und somit unter ähnlichen Bedingungen entsteht, wie die ebenfalls aus Einzelzellen entstehende Impfgeschwulst, die sich nach subkutaner Implantation von Aszitestumorzellen erzeugen lässt.

Unter den Impfgeschwülsten bildet der Ehrlich-Mäuse-Aszites-Tumor (EMAT) ein günstiges Modell, da er bezüglich der verschiedenen Impflinien und der chromosomalen Zusammensetzung -Tetraploid (KLEIN, Stockholm), Hypertetraploid (HAUSCHKA, Buffalo) und Hyperdiploid (LETTRE, Heidelberg)- gut bekannt ist, und in Aszitesform Tumorzellen in einer weitgehend leukozytenfreien Aszitesflüssigkeit wachsen, so dass subkutane Überimpfungsversuche eine Reinkultur des definierten Zellstammes zur Voraussetzung haben.

Die spezielle Problemstellung bei den subkutanen Implantaten geht davon aus, dass bei den subkutanen Implantaten eine morphologische und fermenthistochemische Differenzierung in Innen- und Aussenzone besteht (EDER und WRBA (12)). Diese Schichtung erinnert an eine Reihe von Beobachtungen, wie sie in der menschlichen Geschwulstpathologie bekannt sind.

Die Frage stellt sich, welche biologische Wertigkeit den verschiedenen Zellen in Innen- und Aussenzonen zukommt. Fermenthistochemische Untersuchungen zeigen zwar den Tatbestand, können aber nichts über biologische Wertigkeit und Wachstum der Zellen in diesen Zonen aussagen. Dies ist jedoch möglich mit autoradiographischen Untersuchungen unter Verwendung von H^3 -Thymidin.

Thymidin ist ein selektiver Vorläufer der DNS und wird ausschliesslich während der für viele Zellen etwa 7-8 Stunden andauernden DNS-Synthesezeit in den Kern eingebaut (GALL (17), Koburg und SCHULTZE (37)), wobei H^3 -Thymidin nur ca. 40 Minuten zur Verfügung steht (MAURER und KOBURG (47)). Nach

dem Einbau in den Kern ist das Thymidin stoffwechselstabil und unterliegt keinen weiteren Veränderungen (HUGHES (31)). In der 40 Minuten langen Verfügbarkeitszeit markieren sich alle Kerne, die sich zu diesem Zeitpunkt in der DNS-Synthese befinden, wobei pro Zeiteinheit die Zellen gleicher Ploidiestufen die gleiche Menge H^3 -Thymidin einbauen (KOBURG und SCHUTZE (37)). Dabei markieren sich nur die Zellkerne, die H^3 -Thymidin in die DNS eingebaut haben, nicht eingebautes H^3 -Thymidin würde bei der Herstellung des Autoradiogramms ausgewaschen werden (KOBURG (36)). Beginnt die Zelle nach Ablauf der prämitotischen Ruhephase die Zellteilung, so wird das inkorporierte H^3 -Thymidin zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben (HUGHES (31)).

Werden hiervon histologische Präparate angefertigt und mit einem lichtempfindlichen Film oder flüssiger Filmemulsion exponiert, so werden durch die Emission der Beta-Strahlen des aktiven Thymidins die Silberkörnchen der Filmschicht geschwärzt. Da der Film oder die Emulsion dem Präparat fest aufliegen, befinden sich die geschwärzten Silberkörnchen der Filmschicht topographisch genau über den H^3 -Thymidin markierten Zellen, so dass H^3 -Indexbestimmungen (d. h. markierte Zellen/Gesamtzellzahl) und Silberkörnchenzählungen über den einzelnen Zellkernen durchgeführt werden können.

Mit dieser Methode (Ausführlicheres s. HABERS (20) und OEHLERT und Mitarbeiter (49)) lassen sich Wachstumsvorgänge und Wachstumsgeschwindigkeit an Zellen normaler Organe und Tumorgewebe verfolgen.

UNTERSUCHUNGSGUT UND METHODIK

Sämtliche Untersuchungen wurden am hyperdiploiden Ehrlich-Mäuse-Aszites-Tumor durchgeführt, der auf Mäusen des NMRI Mäusestammes gehalten wurde.

1. Untersuchungen an soliden subkutanen Tumoren:

- a) Überimpfung markierter Tumortransplantate: Drei weiblichen 15-20 Gramm schweren weissen Mäusen mit 7, 9 und 10 Tagen alten EMAT wurden je 5 mikro C/g Körpergewicht H^3 -Thymidin (Spezifische Aktivität: 3.0 C/m Mol) intraperitoneal gespritzt. Die Tiere wurden nach 1, 6 und 24 Stunden getötet und die markierten Aszitestumorzellen nach mehrfacher Waschung in Ringerlösung 15 weiteren Mäusen subkutan implantiert. Diese Tiere wurden nach 1, 6, 24, 48 und 72 Stunden in Äthernarkose getötet.
- b) Überimpfung von Tumorzellen und Markierung der Implantate: 10 und 18 Tage lang auf den Trägartieren gewachsene Aszitestumorzellen wurden auf 10 Versuchstiere subkutan überimpft. 1, 6, 24 und 48 Stunden nach der Implantation wurden 5 mikro C/g Körpergewicht H^3 -Thymidin intraperitoneal gespritzt und die Tiere 1 Stunde nach H^3 -Thymidinzufuhr getötet. Ausser den Tumorgeweben wurden Vergleichsorgane (Darm und Haut) für die autoradiographische Untersuchung entnommen. Es wurden die Gewebstücke in neutralem 10 % Formalin 24 Stunden fixiert, in Paraffin eingebettet und 5 μ dicke Schnitte zur Autoradiographie angefertigt.

2. Untersuchungen von Aszitestumorzellen verschiedener Alter:

EMAT, der 7 Tage auf Trägartieren gewachsen war, wurde in mehreren Versuchsreihen intraperitoneal auf 15 Mäuse überimpft; diese erhielten nach 24 und 48 Stunden sowie nach 4, 7 und 10 Tagen 5 mikro C/g Körpergewicht H^3 -Thymidin intraperitoneal gespritzt. Die Tiere wurden 1 Stunde nach der Injektion getötet, die Aszitesflüssigkeit abpunktiert, auf Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Es wurden gleichzeitig bei einigen Tieren Organe (Darm, Haut, Zunge und Ösophagus) entnommen. Bei zwei Tieren mit 6 Tage lang gewachsenem EMAT wurden am Tag vor der einstündigen H^3 -Thymidinmarkierung die Zungen eingeschnitten, um die Zellwachstumsrate in den Zungen zu erhöhen.

Die Schnitte und Ausstriche wurden nach der autoradiographischen Technik mit flüssiger Emulsion Ilford G-5 und K-2 (ILFORD Ltd. ESSEX, England) 5 bzw. 14 und 21 Tage oder mit Strippingfilm Kodak AR 10 21 und 30 Tage exponiert. Nach Entwicklung und Fixierung wurden die Präparate 10 Minuten mit Böhmerschen Hämatoxylin und 0,03 % Eosin gefärbt, luftgetrocknet und mit Glyzeringelatine eingedeckt.

Auswertung der Präparate

Die Markierungsindexbestimmungen (Markierte Zellen/Gesamtzellzahl) und die Silberkörnchenzählungen über den Zellkernen wurden im Mikroskop mit Ölimmersion (Vergrößerung: Okular 8 x, Objektiv 90 x) durchgeführt. Hierbei wurden in den Schnittpräparaten nur solche Zellen ausgewertet, die in ihrem grössten Durchmesser angeschnitten und nicht mit benachbarten Zellen überlagert waren. Es wurden nur solche Zellen als markiert bewertet, bei denen der Zellkern eindeutig markiert war. Die Zählungen erfolgten mit Zählnetz. Bei den einzelnen Präparaten wurde der entsprechende Leerwert (d.h. nicht durch inkorporiertes H^3 -Thymidin belichtete Silberkörnchen in der Emulsion oder im Strippingfilm) berücksichtigt. Präparate mit zu hohem Leerwert wurden nicht ausgewertet.

Um die Entwicklung der soliden Geschwülste und ihre Differenzierung in Aussen- und Innenzonen verfolgen zu können, wurden in Aussen- und Innenzonen an mindestens je 1000 Zellen der H^3 -Index bestimmt und an den markierten Zellen die Silberkörnchen über den Zellkernen ausgezählt.

Gleichzeitige vergleichende karyometrische Untersuchungen wurden an der Innenzone eines 48 Stunden alten subkutanen Tumorimplantates sowie an 3 Tumor-Asziten 2 und 4 Tage nach der intraperitonealen Transplantation durchgeführt. Hierbei wurden von je 100 Kernen die Silberkörnchenzahlen bestimmt. Diese Kerne wurden mit ihrem grössten Umfang im Projektionsmikroskop auf Zeichenkarton gezeichnet, ausgeschnitten und gewogen. Die Gewichtszahlen wurden in Flächeneinheiten umgewandelt (1 mg des verwandten Zeichenkartonpapiers entsprach $3,9 \text{ mm}^2$). Diese wurden dann über die Flächenformel für Kugelquerschnitte als Volumen ausgerechnet und angegeben.

Bei einem 48 Stunden alten subkutanen Geschwulstimplantat und bei einem Ausstrich eines 4 Tage alten Aszites-Tumors wurden je 100 nichtmarkierte Kerne zu Grössenvergleichsmessungen mit markierten Zellkernen hinzugezogen.

Insgesamt wurden 36 000 Zellen ausgewertet, von denen bei 10 000 Zellen die Zahl der Silberkörnchen pro Zellkern bestimmt wurde.

I. UNTERSUCHUNGEN AN TUMORZELLIMPLANTATEN NACH VORHERIGER MARKIERUNG

Versuchsergebnisse:

Die in dieser Untersuchungsreihe verwandten Tumorzellimplantate haben sich aus Aszites-Tumorzellen entwickelt, denen noch in Aszitesform 1, 6 und 24 Stunden vor der Überimpfung H^3 -Thymidin angeboten wurde, wobei die Ausgangsasziten verschiedene Alter haben (7, 9 und 10 Tage).

Da, wie eingangs schon erwähnt, die Verwertungszeit des radioaktiven Thymidins nur etwa 1 Stunde beträgt, sind in dieser Untersuchungsreihe, bei der markierte wie unmarkierte Tumorzellen übertragen wurden, nur jene Tumorzellen markiert, die zum Zeitpunkt des Thymidinangebotes im Stadium der DNS-Synthese waren und somit die radioaktive Vorläufersubstanz der DNS (Thymidin) in den Kern eingebaut haben.

Ziel dieser Untersuchungsreihe war es, die Lage, das Verhältnis markierter zu unmarkierten Zellen sowie die Markierungsintensität markierter Zellen in Abhängigkeit von der Entwicklung des Tumorzellimplantates zu untersuchen.

Eine Stunde nach der Überimpfung sind die Zellen in allen Tumorabschnitten gleich stark markiert. Eine Trennung in Innen- und Aussenzone, wie von EDER und WRBA (12) für subcutane Implantate älter als eine Stunde angegeben wurde, ist im Autoradiogramm nicht vorhanden. Das Verhältnis markierter zu **unmarkierter** Zellen entspricht dem des Ausgangsaszites, wobei das subcutane Implantat des 7 Tage alten Tumoraszites mit 30,1 % den höchsten H^3 -Index hat gegenüber denen der 9 und 10 Tage alten Tumorasziten mit 21,1 % und 19,5 %.

Nach 24 Stunden ist bei allen Tumoren eine Trennung in Innen- und Aussenzone vorhanden. Die Zellen der Aussenzone lassen einen grossen Kern mit deutlicher Kernstruktur und grossem hellen Zytoplasma erkennen. Die Zellen der Innenzone dagegen sind klein. Der Kern ist stark basophil gefärbt und von einem schmalen Zytoplasmasaum umgeben. Teilweise fehlt das Zytoplasma. Der Markierungsindex nimmt gegenüber den 1 Stunden alten subkutanen Implantaten zu S. Tabelle 1.

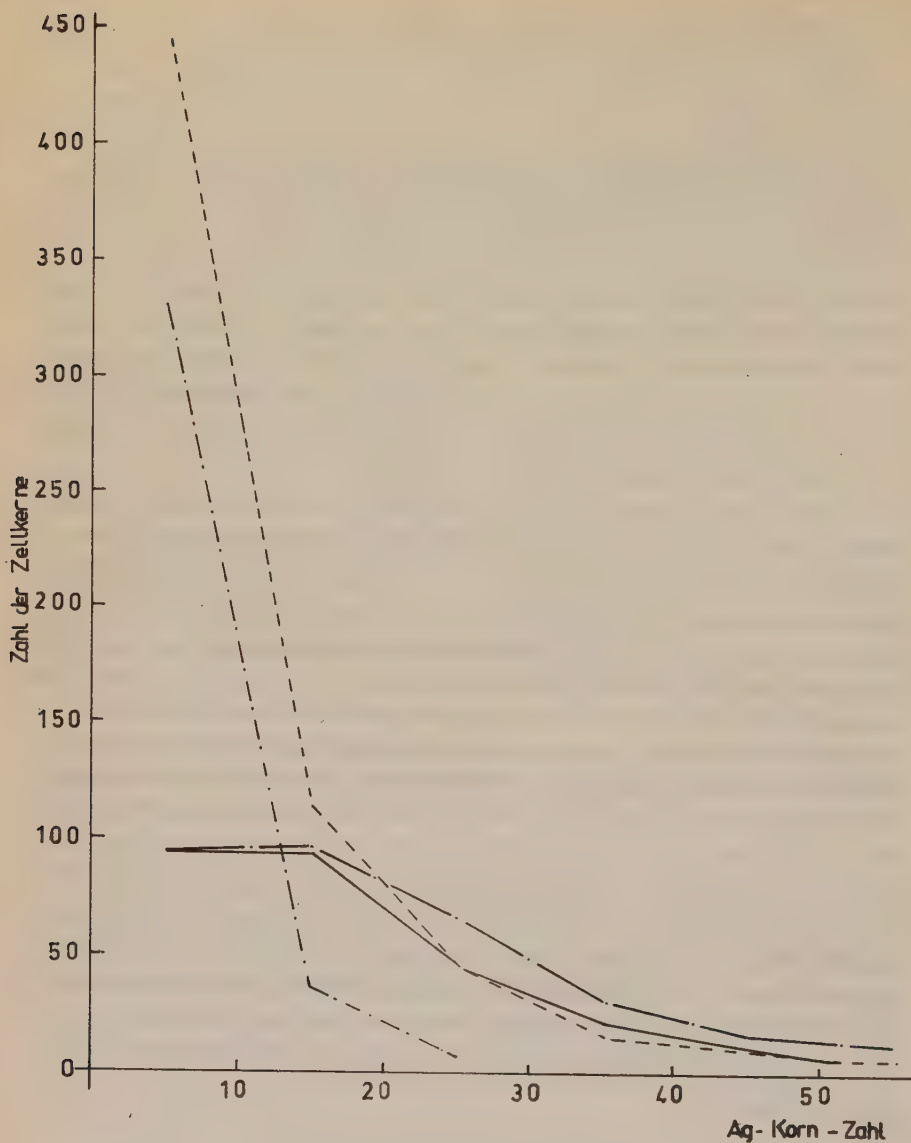


Abb. 1

Silberkörnchenverteilungskurven (Zahl der Zählkerne mit gleicher Körnchenzahl) für die Asziteszellen (—) und der subcutanen Implantate eines 7 Tage alten und 24 Stunden im Trägartier markierten MAT 1 Std. (— · —) und 48 Std. (Außenzone— · —, Innenzone— · —) nach der Überimpfung.

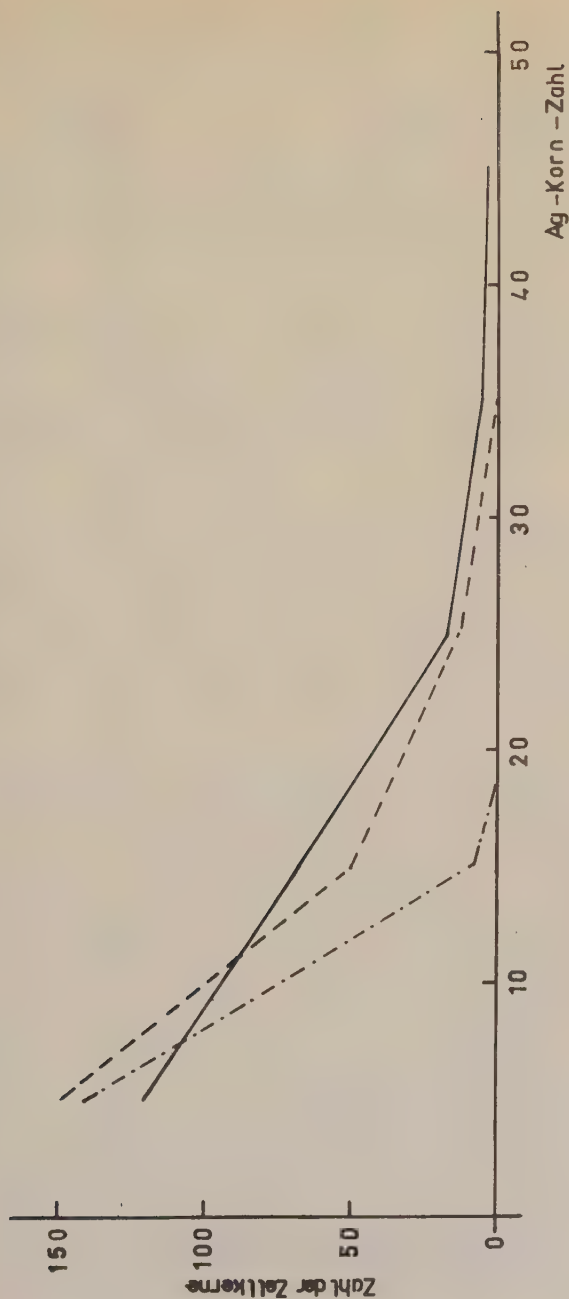


Abb. 2 Silberkörnchenverteilungskurven für die Zellen der subcutanen Implantate eines 9 Tage alten und 1 Std. im Trägartier markierten MAT. 1 Std. (—) und 72 Std. (Außenzone--- und Innenzone-.-.-) nach der Überimpfung.

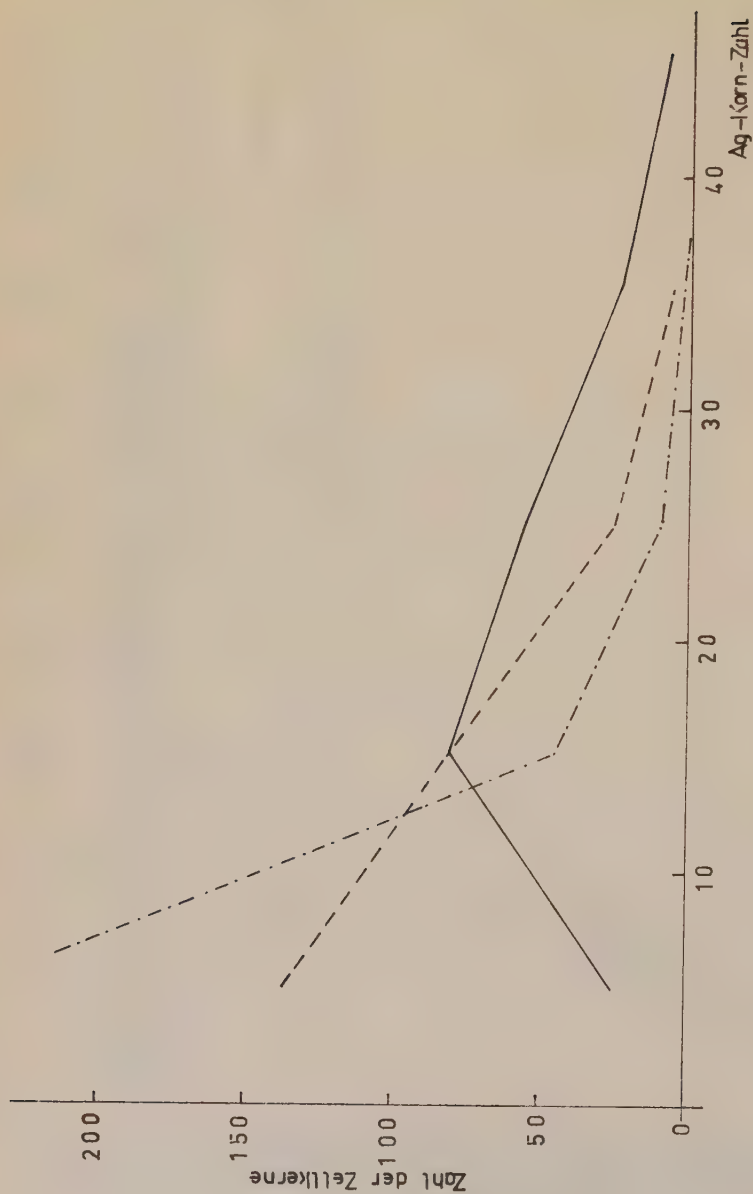


Abb. 3 Silberkörnchenverteilungskurven für die Zellen der subcutanen Implantate eines 10 Tage alten und 6 Std. im Trägartier markierten MAT. 1 Std. (—) und 48 Std. (Außenzone---, Innenzone-.-) nach Überimpfung.

TABELLE 1

 H^3 -Index (%) markiert überimpfter Tumoren verschiedener Alter

Alter in Tagen	Markierungs- dauer	Untersuchungszeit nach						
		1 h	24 h		48 h		72 h	
			AZ	IZ	AZ	IZ	AZ	IZ
7	24 h	30,1	42,7		37,6	62,7		
9	1 h	21,1	27,7	20,6			14,5	22,1
10	6 h	19,5	23,5	25,4	18,1	31,3		

Diese Zunahme beträgt in der Aussenzone des 7 Tage alten Tumoraszites 29,5 %, in der Aussenzone des 9 Tage alten 31,3 %. Dagegen nur 20,5 % in der Aussenzone des 10 Tage alten Tumoraszites. Bei der Innenzone dieses Tumors steigt der H^3 -Index gegenüber dem 1 Stunden Wert um 30,3 % an, bei der Innenzone des 9 Tage alten Tumors verändert sich der H^3 -Index dagegen nicht.

Eine Indexdifferenz zwischen Aussen- und Innenzone ist somit bei den 24 Stunden alten subkutanen Implantaten vorhanden. Diese wird deutlicher bei den 48 Stunden alten Implantaten. Hier sind die Innenzonen stärker als die Aussenzonen markiert. Bei dem 7 Tage alten Tumor nehmen die markierten Zellen in der Aussenzone um 25,0 %, in der Innenzone um 108,3 % gegenüber dem Ausgangswert zu. In der Innenzone des 10 Tage alten Tumors nehmen diese um 60,5 % zu, in der Aussenzone um 7,2 % ab.

Um die Anzahl der Zellkerne mit gleicher Silberkörnchenzahl in den Schnitten mit verschiedenen hohen Markierungsindizes miteinander vergleichen zu können, wurden die gefundenen Werte auf 100 markierte Zellen bezogen. Die Anzahl und prozentuale Verteilung der Zellen mit der gleichen Körnchenzahl pro Zellkern sind bei den 1 Stunden alten Implantaten sowie den Innen- und Aussenzonen der 24 Stunden alten Implantaten innerhalb der verschiedenen alten Aszites-tumoren annähernd gleich. Eine Verschiebung bei den 24 Stunden Werten zu Gunsten der niedrig markierten Zellkerne ist bereits angedeutet.

Bei den 48 und 72 Stunden Werten hat die Zahl der niedrig markierten Zellen in den Innen- und Aussenzonen stark zugenommen. In den Innenzonen sind mehr stark markierte Zellen vorhanden als in den Aussenzonen und weniger als in den 1 Stundenwerten und den Innenzonen der 24 Stunden alten Implantaten. Siehe Kurven Abb. 1 und 2.

Bei dem 7 Tage alten Tumor gehören in der Aussenzone des 48 Stunden Wertes 65,4 % aller markierten Zellen zu der Gruppe mit 2-4 Silberkörnchen pro Zellkern, in der Innenzone dagegen nur 41,5 %.

In der Aussenzone des 72 Stunden Wertes des 9 Tage alten Tumors sind 96,5 % aller markierten Zellen dieser Gruppe zuzurechnen, in der Innenzone 42 %.

Bei dem 10 Tage alten Tumor ist dieser Unterschied nicht vorhanden. Siehe Abb.3.

Morphologisch unterscheiden sich die 48 Stunden alten Implantate von den 24 Stunden alten durch das Auftreten einer breiten Nekrosezone zwischen Aussen- und Innenzone. An der Innenseite dieser Nekroseschicht, aber auch zwischen den Zellen der Innenzone sind basophil angefärbte homogene Niederschläge sichtbar, die eine positive Feulgenfärbung aufweisen und sich stellenweise zu grösseren Ballen zusammenlagern. Diese Niederschläge treten nur in der Innenzone bzw. am Rande der Nekrosezone auf. Sie enthalten H^3 -Thymidin und sind deshalb im Autoradiogramm markiert.

Besprechung der Versuchsergebnisse

Zur Interpretation und Auswertung der vorangehenden Befunde ist es einleitend notwendig, auf eine Anzahl von Schwierigkeiten hinzuweisen, deren Berücksichtigung Voraussetzung für eine richtige Beurteilung der erhobenen Befunde ist. Dies betrifft einerseits die biologischen Schwankungen des Tumorstwachstums, andererseits die Schwierigkeiten, die sich beim Vergleich autoradiographischer Befunde ergeben.

Obgleich die subkutanen Mäuse-Aszites-Tumoren Geschwülste darstellen, die sich aus übertragbaren Einzelzellen entwickelt haben und somit einen hohen Grad des autonomen, den Regulationen entzogenen Tumorstwachstums (BÜNGLER (8)) erkennen lassen, gilt auch für den MAT, wie für alle implantierten Geschwülste, die bereits 1907 von BASHFORD (5) festgestellten Schwankungen des Tumorstwachstums in Abhängigkeit vom Alter der Trägiertiere. Dazu kommt bei Transplantaten die Abhängigkeit vom Ort der Impfstelle und Menge der zu implantierenden Tumorzellen.

Die Abhängigkeit von der Ernährung und Blutversorgung (HAMPERL (21)) und die möglicherweise daraus resultierenden Veränderungen der Tumoreigenschaften müssen ebenfalls mit berücksichtigt werden. So wurden unter anderen von SCHAIRER (56) individuelle Wachstumsunterschiede bei Wirtswechsel sowie bei der Überimpfung von transplantablen Geschwülsten angenommen.

HUTH (33) hat für unterschiedliches Wachstum des MAT das Vorhandensein von verschiedenen akzessorischen Wuchsstoffen bei den einzelnen Tieren angenommen.

Darüber hinaus ist eine Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit des EMAT von Art des Tages- und Nachtrhythmus (PETERS (52)) diskutiert worden, LENNARTZ, MAURER und SCHÜMMELFELDER (39) fanden jedoch für Aszites keine

tageszeitlichen Schwankungen in Hinblick auf den Generationszyklus. Zur Ausschaltung der Schwierigkeiten wurde in der vorliegenden Untersuchungsreihe eine gleichartige Technik der Überimpfung mit gleichbleibenden Überimpfungsstellen und gleich grosser Mengen von Tumorzellen angewendet. Einflüsse in Form eines Wirtswechsels wurden zu vermeiden versucht, durch Verwendung des gleichen Inzuchtstammes für Träger- und Empfängertiere und darüber hinaus durch die Wahl gleicher Tageszeiten sowohl für Markierung als auch Überimpfung.

Um autoradiographische Präparate vergleichen zu können, ist es wichtig, die gleiche Menge H^3 -Thymidin zu spritzen, da sich sonst Änderungen in der Markierungsintensität der Zellen bei den verschiedenen Tumoren ergeben könnten, nicht betroffen davon ist der H^3 -Index (BASERGA (4)). Die Silberkörnchenzahl ist weiterhin abhängig von der Art und Schichtdicke der flüssigen Emulsion, von der autoradiographischen Technik, von einem geometrischen Faktor, d.h. der Distanz zwischen dem Ort der Strahlung und der Emulsion, sowie vom Strahlungswinkel der beta-Teilchen (NORRIS (48)).

Eine weitere Fehlerquelle entsteht durch unterschiedliche Schrumpfung der Zellen und Schnittdicke der Präparate, wobei eine unterschiedliche beta-Selbstabsorption entstehen kann (MAURER u. PRIMBSCH (46), WIMBER (65)). Diese Fehler können zum Teil durch eine gleichbleibende Technik beim Anfertigen der Präparate verringert werden. Bei den hier vorliegenden Versuchen wurde deshalb auch mit Strippingfilm neben der flüssigen Emulsion gearbeitet, da hierbei durch die gleichmässige Dicke der Filmschicht quantitätsmässige Unterschiede in der Körnchenzahl pro Zellkern von der technischen Seite vermieden werden können, und somit eine bessere Beurteilung bei Serienuntersuchungen möglich ist.

Wie der übereinstimmende Verlauf der Silberkörnchenverteilungskurven (Abb. 1) des 7 Tage alten Aszites und seines 1 Stunden alten subkutanen Implantates zeigen, ist ein Vergleich der autoradiographischen Präparate durchaus möglich.

Der H^3 -Index des 7 Tage alten Aszitestumors stimmt mit den gefundenen Werten von OEHLERT, LAUF und SEEMAYER (50) bei etwa gleichaltrigen Tumoren überein. EDWARDS und Mitarbeiter (16) fanden dagegen am EMAT einen höheren Markierungsindex (45 %), der wohl darauf zurückzuführen ist, dass hier jüngere Aszitestumoren untersucht wurden. Nach BASERGA (3) und EDWARDS (16) bleibt der Prozentsatz der markierten Tumorzellen während der bis einschliesslich 6 Tage dauernden exponentiellen Wachstumsphase gleich, und sinkt ab dem 7. Tag ab. Daraus erklären sich auch die niedrigen H^3 -Indexwerte der 1 Stunden alten subkutanen Implantate bei den 9 und 10 Tage alten Tumoren. Dabei muss berücksichtigt werden, dass der 7 Tage alte Aszitestumor 24 Stun-

den lang markiert war und dadurch schon Tochterzellen markiert sein können, da die durchschnittliche Generationszeit für 3 und 4 Tage alte EMAT zwischen 15 und 24 Stunden von den einzelnen Autoren angegeben wird (BASERGA (4), EDWARDS (16), LENNARTZ (39) und NORNSEY (28), KOBURG und MAURER (38)).

Die von EDER und WRBA (12) bei fermenthistochemischen Untersuchungen an 1 Stunden alten subkutanen Implantaten beschriebene Differenzierung der Zellen in Hinblick auf ihre Abhängigkeit von der Lagerung innerhalb des Tumors, tritt bei den autoradiographischen Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt noch nicht auf. LÖHRS (44) findet bereits bei 1 Stunden alten subkutanen Implantaten eine durchschnittliche Volumenvergrößerung der Zellkerne in der Aussenzone gegenüber den Ausgangszites um 46 %, bei den späteren Untersuchungszeiten dagegen eine deutliche Kernverkleinerung der Zellen der Innenzone gegenüber dem Ausgangszites. Da bei den 1 Stunden alten Implantaten keine Unterschiede zwischen den peripher und zentralgelagerten Zellen in H^3 -Index bestehen, dürfte es sich bei der anfangs nachgewiesenen Volumenvermehrung um ein funktionelles Kernödem handeln (STÖCKER (59)).

Eine Differenzierung in Innen- und Aussenzone in Bezug auf den H^3 -Index beginnt dann bei den 9 und 10 Tage alten Tumoren 24 Stunden nach der Implantation, wie aus Tabelle Nr. 1 zu ersehen ist, wobei auffällt, dass der H^3 -Index der Aussenzone bei allen drei Tumoren zunimmt, während sich die Innenzonen der 9 und 10 Tage alten Tumoren verschieden entwickeln. Letzteres kann wohl auf unterschiedliche Milieubedingungen zurückgeführt werden. Bei den Indexanstiegen in Aussen- und Innenzonen innerhalb der ersten 24 Stunden scheint es sich noch um den Ausdruck eines echten Tumorwachstums zu handeln, da sich mit dem Anstieg des H^3 -Index auch die Körnchenverteilungskurven mit ihren Maxima in Richtung Zellkerne mit niedrigen Silberkörnchenzahlen pro Zellkern verschieben.

Während in den ersten 24 Stunden die Indexzunahme durch normale Kernteilung in Innen- und Aussenzonen zu erklären ist, trifft das für die 48 und 72 Stunden alten Implantate nicht mehr zu.

Das morphologische Bild der Zellen der Aussenzonen entspricht bei diesen Untersuchungszeiten dem typischen Aussehen wachsender Tumorzellen. Die Aussenzone wird dabei breiter und wie aus den Untersuchungen von EDER und WRBA (12) sowie HÖRNER (26) bekannt ist, beginnen die Zellen der Aussenzone nach etwa 48 Stunden infiltrativ in das umgebende Bindegewebe einzuwachsen. Diese Befunde stehen mit den Ergebnissen bei den autoradiographischen Untersuchungen am 48 und 72 Stunden alten Implantaten in guter Übereinstimmung, obwohl zu diesen Untersuchungszeiten die Anzahl der markierten Zellen in den

Aussenzonen geringer ist als bei den 24 Stunden alten Tumoren. Diese Tatsache spricht eigentlich für eine Abnahme der Wachstumsrate. Da aber gleichzeitig die Zahl der niedrig markierten Zellen stark zugenommen hat, kann die Abnahme des H^3 -Index kein Wachstumsverlust bedeuten. Das Verschwinden der hochmarkierten Zellen zu Gunsten der niedrig markierten Zellen ist gerade bei der angewendeten Methode charakteristisch für stattgefundene Zellteilungen.

Da bereits nach 24 Stunden die Gruppe der Zellkerne mit 2-4 Körnchen 24 % bzw. 39 % der Gesamtzahl der markierten Zellen bei den Aussenzonen der 7 und 9 Tage alten MAT ausmachen, werden nach einer erneuten Zellteilung diese Zellen nicht mehr bei der Zählung erfasst. Bei späteren Untersuchungszeiten als 72 Stunden würden die Zellen der Aussenzone keine eindeutige Markierung mehr zeigen, da bereits bei diesem Tumor nach 72 Stunden 96,5 % der markierten Zellen nur 2-4 Körnchen pro Zellkern aufweisen.

Einen Gegensatz dazu bildet bei den 48 und 72 Stunden alten subkutanen Tumoren das Verhältnis der hohen H^3 -Indizes in den Innenzonen zu der Anzahl der Silberkörnchen über den einzelnen Zellkernen. Wenn hier trotz so hohem H^3 -Index die Abnahme der Markierungsintensität der einzelnen Kerne eine geringere als in den Aussenzonen ist, wie in Abbildungen 1 und 2 sichtbar, kann der hohe H^3 -Index nicht Ausdruck eines normalen Zellwachstums sein, da sonst mit Zunahme des H^3 -Index die Anzahl der Silberkörnchen pro Zellkern abnehmen müssten. Dass in den Innenzonen jedoch auch normale Kernteilungen vorkommen können, beweisen die Mitosen, die aber seltener als in den Aussenzonen sichtbar sind.

Die H^3 -Indexdifferenz zwischen den Innen- und Aussenzonen könnte auf einen unterschiedlich langen Generationszyklus der Zellen in den beiden Zonen beruhen. Bekanntlich unterscheidet man im Generationszyklus mehrere Phasen (EDWARDS (16), BASERGA (4), KOBURG und MAURER (38), LENNARTZ (39) u.a.). Nach Durchlaufen der G_1 -Zeit (postmitotische bzw. präsynthetische Ruhepause) beginnt die Zelle DNS zu synthetisieren (DNS-Synthesezeit), verharnt dann kurze Zeit (G_2 -Zeit oder prämitotische Ruhezeit), um anschliessend in die Mitose einzutreten. Während für normale Gewebszellen die einzelnen Phasen in Bezug auf ihre zeitliche Dauer für relativ konstant gehalten werden, können scheinbar bei Karzinomen und bei Zellen mit übersteigerter Proliferation beträchtliche Schwankungen sowohl bei der DNS-Synthesezeit, als auch bei der G_1 und G_2 -Zeit auftreten. (LENNARTZ (39), OEHLERT (50) und STÖCKER (60)). OEHLERT und Mitarbeiter (50) fanden bei EMAT 10-14 Tage nach intramuskulärer Überimpfung für die Zellen der Innenzonen eine Verlängerung der Generationszeit auf 27-30 Stunden, wobei sie diese auf eine Verlängerung der prämitotischen Ruhephase zurückführen.

LENNARTZ (39) nimmt für seine Untersuchungen mit doppelt markierten Zellen

bei 6 Tage alten MAT eine relativ konstante Zeitdauer für die DNS-Synthesezeit, Mitose und G_2 -Zeit an, dagegen aber eine Verkürzung der G_1 -Zeit. Auf Grund der Berücksichtigung dieser Untersuchungen sowie der von HUTH (32), HOMANN (27), LEVAN und HAUSCHKA (43) und OEHLERT und Mitarbeiter (50), die bei den Zellen der Innenzonen des MAT Degenerationsformen, Endomitosen und Polyploidisierungsvorgänge beschrieben haben, lässt sich das Vorkommen von hochmarkierten Zellkernen in den Innenzonen erklären, nicht aber die hohen H^3 -Indizes.

Es ist auch nicht anzunehmen, dass die Zellen der Innenzonen unterschiedliche genetische Strukturen besitzen. Bei dem EMAT sind zu jeder Zeit nach der Überimpfung alle Zelltypen vorhanden (PROBST (53)), wobei diese den von HUTH (33) und SEEGER (58) beschriebenen vier Klassen entsprechen. Da jeder Tumor eine spezifische Chromosomenkonstitution hat, und diese über mehrere Transplantationen unverändert bleibt (MAKINO und KOYOTO (45)), ist es nicht anzunehmen, dass ein Teil der Zellen im Zentrum die Fähigkeit zu exzessiven Wachstum haben, während andere überhaupt kein Wachstum zeigen.

Ferment histochemische Untersuchungen von EDER und WRBA (12), karyometrische Messungen (EDER, WRBA und LÖHRS (14) und LÖHRS (44)) sowie die autoradiographischen Untersuchungen zeigen, dass kurze Zeit nach der Implantation von Asziteszellen die späteren Zellen der Innenzonen die gleichen Eigenschaften aufweisen, wie die Zellen der Aussenzonen.

Morphologisch findet sich 48 und 72 Stunden nach subkutaner Implantation eine vollentwickelte Differenzierung in Aussen- und Innenzone, wobei in der Innenzone (bereits von HÖRNER (26) beschrieben) zahlreiche pyknotische Zellen, Zelltrümmer und zwischen Aussen- und Innenzone eine breite Nekroseschicht sichtbar ist. Bereits hieraus geht hervor, dass zahlreiche Zellen der offensichtlich unter ungünstigen Stoffwechselbedingungen (vermutlich diffusionsabhängig) entstehenden Innenzone untergehen. Beweisend hierfür ist u. a. auch die Tatsache, dass nekrotisches Zellmaterial zwischen noch intakten Zellen eine Tritiumstrahlung aufweist, so dass derartige Niederschläge autoradiographisch markiert sind.

Da bei der angewandten Versuchsmethode dieser Untersuchungsreihe die Tumorzellen auf dem ursprünglichen Trägartier markiert wurden, zudem die Tumorzellen vor der Überimpfung gewaschen wurden, kann diese Tritiumstrahlung in den nekrotischen, durch die Fixation niedergeschlagenen Partikelchen nur aus den Zellkernen ursprünglich markierter und später untergegangener Zellen stammen.

Zu dem konnte nachgewiesen werden, dass diese Niederschläge eine positive Feulgenreaktion eingehen, so dass es sich hierbei um niedergeschlagene DNS-Mengen aus untergegangenen Zellen handeln muss.

Um so auffallender ist die Feststellung, dass die nicht untergegangenen Zellen der Innenzonen gegenüber den Aussenzonen einen so hohen H^3 -Index aufweisen und zwar sowohl nach 48 Stunden wie nach 72 Stunden. Damit entfällt auch die Möglichkeit, dass der nachgewiesene Zelluntergang in der Innenzone nur Zellen in einer bestimmten Generationszeit betrifft, so dass durch eine relative Selektion mit der Verschiebung des Verhältnisses markierter zu unmarkierter Zellen der hohe H^3 -Index entstehen könnte. Somit bietet sich als einzige Erklärungsmöglichkeit die Tatsache an, dass unter den ungünstigen Bedingungen der Innenzone ein Teil der Zellen untergeht und nekrotisch wird, die noch vitalen Zellen DNS-Bruchstücke wiederverwerten und in den Kern einbauen, so dass hierdurch der hohe Markierungsindex entsteht (EDER und WRBA (13) sowie EDER, WRBA und MUTH (15)).

Die Annahme der Möglichkeit einer Phagozytose makromolekularer Bruchstücke durch Tumorzellen ist nicht neu. RYSER und Mitarbeiter (55) beobachteten das Eindringen von Makromolekülen und Zellfragmenten in intakte Tumorzellen. GRAHAM (18) spricht dabei von Autophagie der Tumorzellen, und DIDERHOLM (11) diskutiert bei Untersuchungen mit H^3 -Thymidin ebenfalls die Wiederverwertung von Thymidin.

Für den EMAT konnten LETTRE und Mitarbeiter (40) eine Phagozytose von Zellbestandteilen durch intakte Asziteszellen nachweisen. Dass diese phagozytierten Makromoleküle durchaus für den Stoffwechsel der Zellen von Bedeutung sind, zeigt der Anstieg der Mitosezahl nach Hinzufügen von Tumorphomogenat zu Asziteszellen (LETTRE, WRBA und SEIDLER (41)). Wenn somit die Möglichkeit einer Phagozytose und Wiederverwertung nach den hier vorliegenden Befunden angenommen werden muss, so stellt sich die Frage, ob es sich bei einer derartigen Reverwertung markierten Thymidins um Aufnahme abgebauter DNS bis auf die Stufen der Purinbasen, oder ob es sich hierbei um grosse DNS-Bruchstücke handelt. Da die Feulgenfärbung an den Niederschlägen nekrotischer Zellen positiv ist, zudem im Zytoplasma noch intakter Tumorzellen kleine feulgenpositive Tröpfchen nachgewiesen werden, müssen diese Teilchen nicht nur Purinbasen, sondern auch Desoxyribosen enthalten, da die Feulgenfärbung auf der Anwesenheit von Desoxyribose beruht. Hieraus kann zumindest gefolgert werden, dass noch grosse desoxyribosehaltige DNS-Bruchstücke vorliegen, die phagozytiert und wieder reverwertet werden.

In den Innenzonen der 48 und 72 Stunden alten Implantaten ist offenbar das Substratangebot durch die Nekrose vieler Tumorzellen für die lebenden Zellen sehr gross, so dass "durch das vermehrte Substratangebot über den umgekehrten Pasteureffekt eine gesteuerte Glykolyse und ATP-Gewinn ausgelöst wird. Diese vermehrte Energie befähigt die Zelle mit Hilfe eines energieverbrauchenden Vorganges Granula zu phagozytieren" (WRBA (66)). Somit ist die Aufnahme von Zellbestandteilen abhängig von der Intensität der Glykolyse, wobei WRBA und

GLESSLER (69) bei ihren Untersuchungen eine Verminderung der Phagozytosefähigkeit durch Hemmung der Glykolyse, eine Steigerung durch Glukosezusatz erreichten.

Die Möglichkeit der Tumorzellen ihren Stoffwechsel sowohl durch Atmung als auch durch Glykolyse aufrecht zu erhalten, ist seit den Versuchen von O. WARBURG (64) bekannt. Somit kommen nicht nur den infiltrativ wachsenden Zellen der Aussenzone, sondern auch den kleinen Zellen der Innenzone eine Bedeutung bei der Erhaltung des Tumors zu. WRBA und EDER (67) haben bei Umlagerungsversuchen die Zellen der Innenzonen nach aussen gebracht und somit in bessere Umweltsbedingungen. Dabei zeigte sich, dass sich noch nach 2-4 Tagen die Zellen der Innenzone zu normalen Zellen der Aussenzone entwickeln können, um dabei wieder die gleiche Fermentreaktion aufzuweisen, die sie kurz nach der Implantation zeigten und während ihrer Lagerung in der Innenzone verloren hatten.

Es wird notwendig sein, am Ende der Ausführungen nochmals auf das Phänomen der kleinen Zellen der Innenzone im Hinblick auf die Untersuchungen von HÖRA (24), HÖRNER (25) und BORST (7) einzugehen.

Ob auch in den Zellen der Aussenzone eine Wiederverwertung von DNS-Bruchstücken nekrotischer Zellen stattfindet, kann bei diesen Untersuchungen nicht entschieden werden. Trifft dies zu, so nur für solche Zellen, die in der Innenschicht der Aussenzone liegen und Verbindung zur Nekrosezone haben.

Dass Phagozytose nicht bei allen Tumoren und nicht mit gleicher Intensität vorkommt, zeigen die Silberkörnchenverteilungskurven für die Zellen der Innen- und Aussenzone des 48 Stunden alten subkutanen Implantates beim 10 Tage alten MAT. Wie aus Abb.3 ersichtlich, zeigen hier die Silberkörnchenverteilungskurven einen nahezu ähnlichen Verlauf.

Wie weit Bildung und Entwicklung der Innenzone von Diffusionsfragen abhängig ist, kann mit der hier angewandten Versuchsanordnung nicht beantwortet werden. Dies kann nur geprüft werden, wenn eine autoradiographische Markierung durch Zufuhr von H^3 -Thymidin am Trägartier eines subkutanen Implantates erzeugt wird. Da auch die Silberkörnchenverteilungskurven nach einstündiger Markierung einen besseren Einblick in die Fragen der Beziehung von Kerngrösse und DNS-Gehalt sowie eine Aufschlüsselung der Silberkörnchenverteilungskurven im Hinblick auf die Ploidiestufen des EMAT ermöglichen, wurden bei den folgenden Versuchen 10 und 18 Tage alte MAT auf verschiedene Tiere subkutan überimpft, diese nach verschiedenen Zeiten eine Stunde mit H^3 -Thymidin markiert und danach getötet.

II. UNTERSUCHUNGEN AN EINSTÜNDIG MARKIERTEN SUBKUTANEN IMPLANTATEN UND TUMORASZITESZELLEN

In dieser Untersuchungsreihe wurden sowohl den subkutanen Implantaten als auch Aszitestumorzellen 1 Stunde lang H^3 -Thymidin angeboten. Es wurden untersucht:

- Subkutane Implantate 10 und 18 Tage alter EMAT zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Implantation.
- Aszitestumorzellen verschiedener Alter (48 Stunden, 4 und 7 Tage).

Ausserdem wurden in dieser Untersuchungsreihe neben den autoradiographischen Untersuchungen vergleichende karyometrische Untersuchungen durchgeführt.

Versuchsergebnisse

- Eine Stunde nach der subkutanen Implantation von 10 und 18 Tage alten MAT ist bei den autoradiographischen Untersuchungen eine Differenzierung in Aussen- und Innenzone noch nicht aufgetreten. Die H^3 -Indices der subcutanen Tumoren nach verschiedenen Untersuchungszeiten sind in Tabelle 2 wiedergegeben. 1 Stunde nach der subcutanen Implantation zeigen die H^3 -Indices der beiden MAT nur einen geringen Unterschied. Die Markierungintensität der Tumorzellkerne ist dabei in Peripherie und Zentrum gleich gross. Eine Nekrosezone ist zu diesem Untersuchungszeitpunkt bei den subkutanen Implantaten beider Aszitestumoren nicht ausgebildet.

TABELLE 2

H^3 -Index (%) subkutaner Implantate von 10 und 18 Tage alten MAT bei einstündiger Markierung

Alter in Tagen	Untersuchungen nach					
	1 h	6 h		24 h		48 h
		AZ	IZ	AZ	IZ	AZ IZ
10	11,7			32,2		16,6 13,0
18		38,7	0		0	
	13,4			27,8		47,9

Bei dem 48 Stunden alten subkutanen Implantat des 10 Tage alten Aszitestumor ist morphologisch eine Trennung in Innen- und Aussenzone vorhanden, wobei aber die Entwicklung einer Nekrosezone ausgeblieben ist. Autoradiographische Untersuchungen ergeben jedoch keinen Differenzierungsunterschied zwischen den Zellen der Aussen- und Innenzone. Die H^3 -Indexdifferenz zwi-

schen der Aussenzone (H^3 -Index 16,6 %) und Innenzone (H^3 -Index 13,0 %) ist dafür nicht deutlich genug.

Dabei zeigt die prozentuale Verteilung der Kerne mit gleicher Silberkörnchenzahl ebenfalls keinen wesentlichen Unterschied. Der Mitoseindex, der bei je 2000 Zellen bestimmt wurde, beträgt in der Innenzone 0,9 %, in der Aussenzone 2,2 %.

Ganz anders dagegen verhalten sich die subkutanen Implantate des 18 Tage alten MAT.

Bereits 6 Stunden nach der Überimpfung ist eine deutliche Trennung in Innen- und Aussenzone vorhanden, wobei sich schon eine schmale Nekrosezone zeigt, diese nimmt bei späteren Untersuchungszeiten an Breite zu. Während bei dem 48 Stunden alten Implantat des 10 Tage alten MAT keine signifikante H^3 -Indexdifferenz zwischen den Zellen der Aussen- und Innenzone bestand, markieren sich bei den subkutanen Implantaten des 18 Tage alten MAT 6, 24 und 48 Stunden nach der Überimpfung die Zellen der Innenzonen nicht.

Da bei den Untersuchungen auffiel, dass die Aussenzonen bei den einzelnen Implantaten dieses Tumors nicht gleichmässig markiert waren, wurden in den Aussenzonen Silberkörnchenzählungen und Indexbestimmungen durchgeführt, wobei die Zählungen in Querbändern durch die Tumoren erfolgte. Dabei wurden von jeder Aussenzone 1000 Zellen für die H^3 -Indexbestimmung ausgewertet.

Die Tabelle 3 gibt eine topographische Verteilung der H^3 -Indizes für die äusseren und inneren Anteile der Aussenzonen wieder, wobei der Abfall der H^3 -Indizes von dem äusseren zum inneren Anteil der Aussenzonen sichtbar ist. Mit dieser Abnahme des H^3 -Index innerhalb der Aussenzonen verringert sich auch die Markierungsintensität der einzelnen Zellkerne, so dass die hochmarkierten Zellen in der äussersten Schicht, die niedrig markierten in der inneren Schicht liegen.

TABELLE 3

Topographische Gliederung des Markierungsindex (%) subkutaner Implantate von 18 Tage alten MAT

Untersuchungszeiten in Stunden	A Z		I Z	A Z	
	aussen	innen		aussen	innen
6	48,6	25,1	0	29,5	51,5
24	31,6		0	6,9	45,1
48	65,9	13,3	0	50,4	62,0
1	Keine Trennung in Aussen- und Innenzonen vorhanden. Gleichmässige Markierung in allen Abschnitten.				

Der unterschiedliche DNS-Gehalt der Zellkerne eine Stunde nach der Markierung macht das Vorliegen von verschiedenen Ploidiestufen wahrscheinlich (KLEIN, G. (35) und KOBURG und SCHULZE (37)), deshalb wurden vergleichende Silberkornzählungen an Kernen normaler Organzellen durchgeführt.

Es wurden bei einem Implantat, das eine Stunde lang angelegt war und während dieser Zeit eine Stunde lang Thymidin angeboten bekam, die Silberkörnchenzahl über den Tumorzellen und den Zellkernen der Basalzellschicht der Haut bestimmt, wobei je 100 Kerne ausgewertet wurden. Um die Fehler zu vermeiden, die durch unterschiedliche Behandlung einzelner Präparate während der Anfertigung entstehen, wurden vom Tumor und Haut gemeinsame Präparate angefertigt.

Wie aus der Kurve Abb.Nr.4 zu sehen ist, hat die Kurve für die Basalzellen der Haut ein Maximum bei 20 Silberkörnchen pro Zellkern. Die Kurve zeigt einen steilen Anstieg und einen flacheren Abfall. Die Kurve der Tumorzellen hat dagegen zwei deutliche Gipfel, einen hohen bei 24 und einen flachen bei 48 Silberkörnchen pro Zellkern.

Die Auftragung der Kurven erfolgte nach Einteilung von HINTZSCHE (23). Da es sich bei den Polyploidisierungs Vorgängen um Verdopplungsvorgänge handelt, und somit um biologisch gleichwertige Vorgänge, kann das sinngemäss in der graphischen Darstellung durch die Wahl gleicher Abschnitte zwischen den Ploidiestufen zum Ausdruck gebracht werden, wobei ein Abschnitt in die gleiche Anzahl von Klassen unterteilt wird. Da bekanntlich die Zellen der Basalschicht der Haut diploid sind, entsprechen die Kerne mit 20 Silberkörnchen bei unserem Versuch den diploiden Zellen.

Das Maximum der Zellkerne gleicher Silberkörnchenzahl liegt bei dem subkutanen Implantat bei höheren Werten, gegenüber den diploiden Hautzellen. Etwa 10 % der Tumorzellen zeigen eindeutig doppelt so hohe Silberkörnchenzahlen pro Zellkern. Hinsichtlich der Interpretation dieser Befunde ergeben sich dabei erhebliche Schwierigkeiten (siehe Besprechung der Befunde).

- b) In voller Kenntnis der Schwierigkeiten, die sich beim Vergleich unterschiedlich aufgearbeiteter Objekte des gleichen Tieres ergeben, wurde geprüft, wie sich die Silberkörnchenzahlen markierter Asziteszellen gegenüber den markierten Organzellen verhalten.

Es fanden sich bei einer Maus mit 5 Tage altem EMAT, die 1 Stunde mit H^3 -Thymidin i.m. markiert war, für die Zellen von Zunge, Darm und Ösophagus eingipflige Silberkörnchenverteilungskurven mit Maxima zwischen 12 und 15 Silberkörnchen. Dem gegenüber aber eine dreigipfelige Verteilungskurve für die Tumorasziteszellen im Ausstrich, wobei der Hautgipfel von Zellkernen mit 48, die Nebengipfel von Zellen mit 24 bzw. 96 Silberkörnchen pro Zellkern gebildet werden. S. Abb.Nr.5.

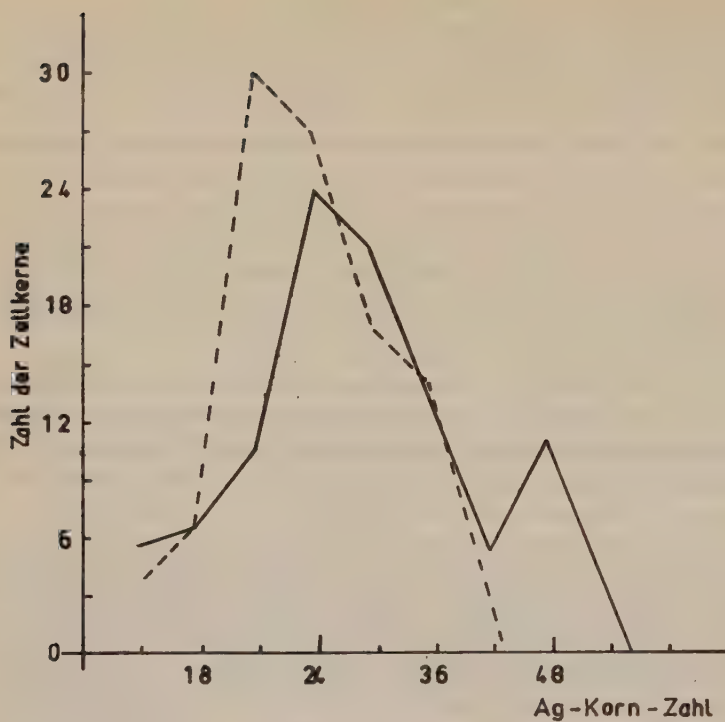


Abb. 4

Silberkörnchenverteilungskurven für 100 Tumorzellen eines 1 Std. alten subcutanen Implantates (—) und für 100 Basalzellen der Haut (---) des gleichen Tieres 1 Std. nach Markierung, dargestellt nach HINTZSCHE.

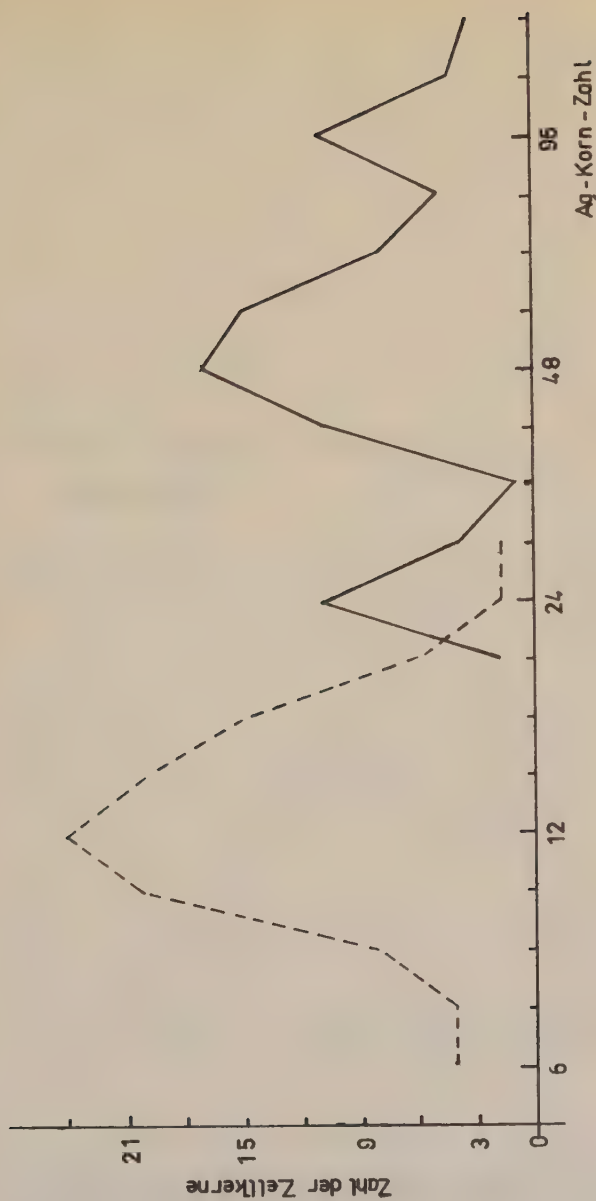


Abb. 5 Silberkörnchenverteilungskurven für 100 Asziteszellen eines 7 Tage alten MAT (—) und für 100 Zellen der Zunge des gleichen Tieres (---) 1 Std. nach Markierung, dargestellt nach HINTZSCHE.

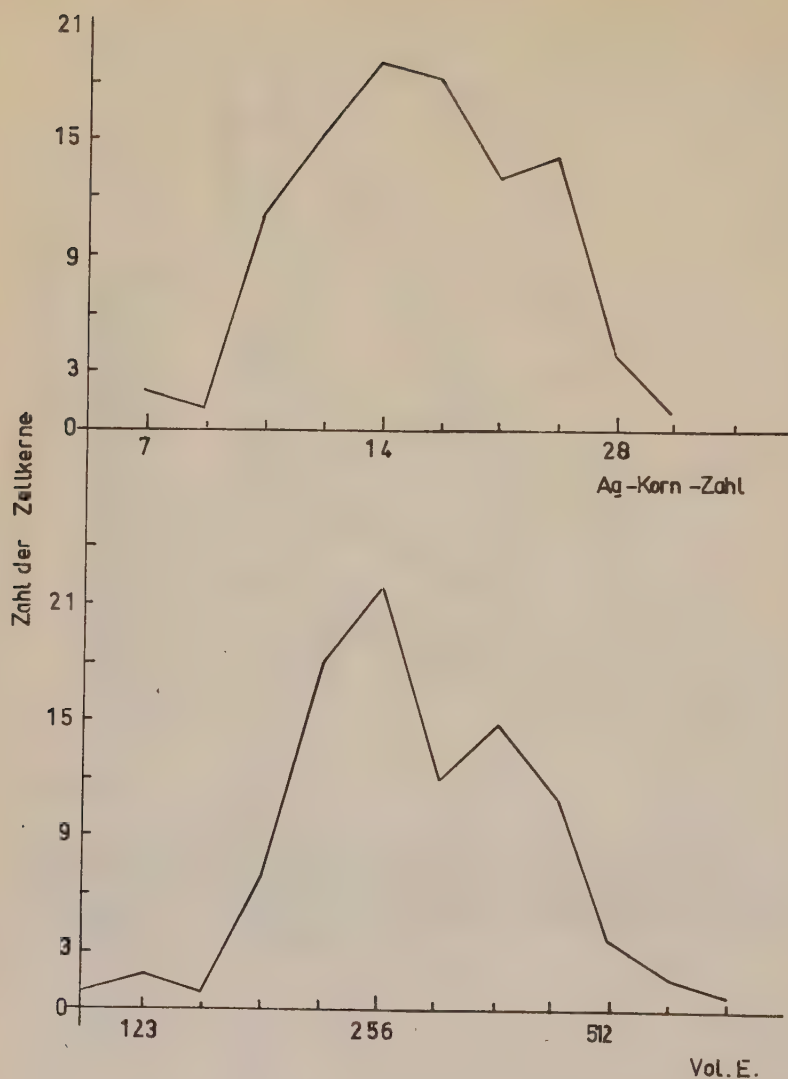


Abb.6

Silberkörnchenverteilungskurve (oben) und Volumensverteilungskurve (unten) für 100 Zellen der Innenzone eines 48 Std. alten subcutanen Implantates 1 Std. nach Markierung, dargestellt nach HINTZSCHE.

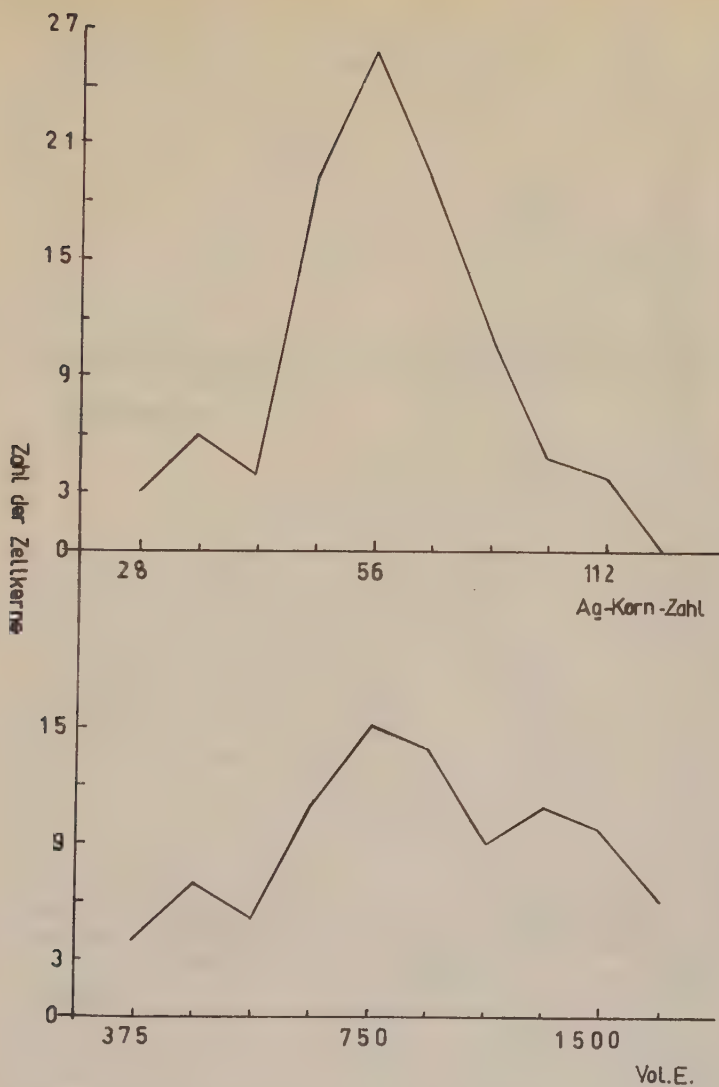


Abb.7

Silberkörnchenverteilungskurve (oben) und Volumenverteilungskurve (unten) von 100 Zellen eines 48 Std. alten Aszites-Tumors 1 Std. nach Markierung, dargestellt nach HINTZSCHE.

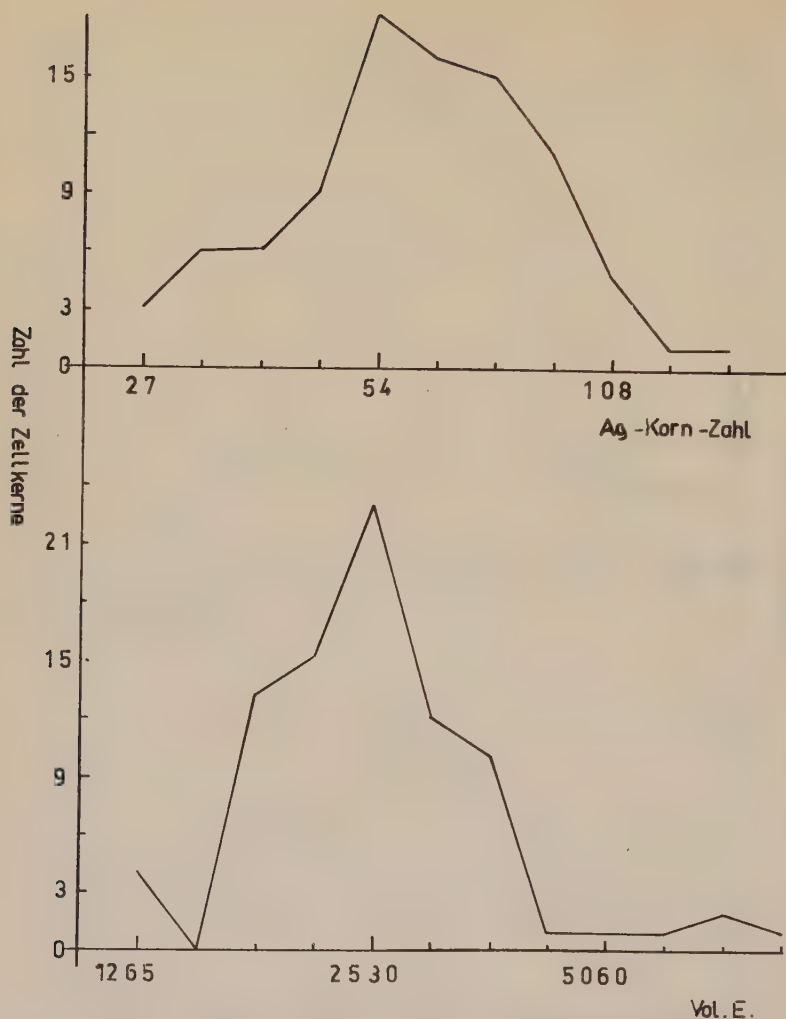


Abb. 8

Silberkornchenverteilungskurve (oben) und Volumenverteilungskurve (unten) von 100 Zellen eines 4 Tage alten Aszites-Tumors 1 Std. nach Markierung, dargestellt nach HINTZSCHE.

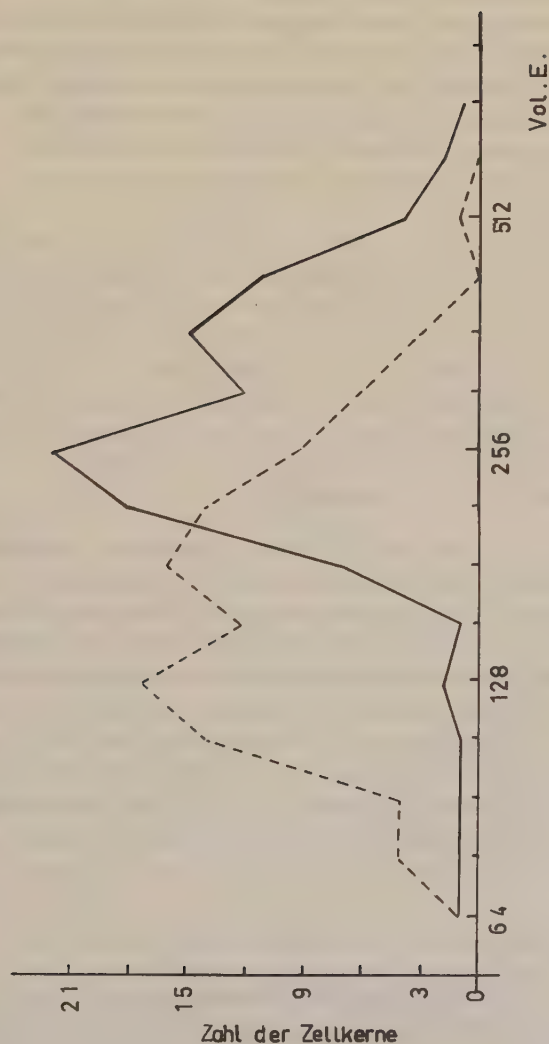


Abb. 9 Volumenverteilungskurven von 100 markierten (—) und 100 unmarkierten(----) Zellkernen der Innenzone eines 48 Std. alten subcutanen Implantates 1 Std. nach der Markierung, dargestellt nach HINTZSCHE.
(Da der H^3 -Index bei 13 % liegt, sind die Maxima der beiden Kurven nicht unmittelbar miteinander zu vergleichen.)

Da die Silberkörnchenverteilungskurven bei einstündig markierten Tumoren einen ähnlichen Verlauf zeigen, wie die Volumensverteilungskurven (LÖHRS (44)), war es naheliegend, die Silberkörnchenzahlen pro Zellkern mit dem Volumen des gleichen Kernes zu vergleichen. Deshalb wurden gemeinsame karyometrische und autoradiographische Untersuchungen an einem 48 Stunden alten und zwei 4 Tage alten Aszitestumoren, sowie an den Zellen der Innenzone eines 48 Stunden alten subkutanen Implantates durchgeführt, wobei von je 100 Kernen pro Tumor die Kernoberflächen bestimmt und die Silberkörnchen über diesen Kernen ausgezählt wurden⁺. Dabei konnte eine Abhängigkeit zwischen Kernoberfläche und Silberkörnchenzahl korrelationsstatistisch gesichert werden. Bei Umrechnungen der Kernoberfläche auf das Kernvolumen zeigte sich eine nur geringfügige Veränderung des Korrelationskoeffizienten, so dass eine errechnete Korrelation zwischen Kernoberfläche und Silberkörnchenzahl auch für das Kernvolumen gilt. (BUSSANY-CASPARI (9)).

In den Abbildungen Nr. 6, 7 und 8 sind Volumen und Silberkörnchenzahl in der Einteilung nach HINTZSCHE (23) aufgetragen. Die Silberkörnchenverteilungskurven haben bei den einzelnen Tumoren annähernd die gleichen Verläufe, wobei alle Kurven je ein deutliches Hauptmaxima und unterschiedlich grosse Vor- und Nachgipfel zeigen. Diese Kurven geben kein vollständiges Bild über die Zusammensetzung der verschiedenen Klassen bei den Tumoren, da der H^3 -Index bei den Aszitestumoren etwa 29 % beträgt und der des subkutanen Implantates 13 %. Es gelangt also nur ein geringer Prozentsatz der Gesamtpopulation zur Auswertung.

Vergleiche der Volumina zwischen markierten und unmarkierten Zellenkernen von je 100 Zellen eines 4 Tage alten MAT und eines 48 Stunden alten Implantates zeigen, dass die Volumina der markierten Zellkerne gegenüber den unmarkierten doppelt so hoch sind. Die Durchschnittswerte der Zellkerne betragen bei den 48 Stunden alten Implantat für die unmarkierten Zellen der Innenzone 177, für die markierten 300 Volumeneinheiten (s. Abb. 9). Beim Tumoraszites betragen die Mittelwerte 1200 für unmarkierte und 2270 Volumeneinheiten für die markierten Zellen. Beide Unterschiede wurden nach dem Sigma-Differenz-Test statistisch gesichert. (Näheres über die statistische Auswertung siehe Udo LÖHRS; Inaugural-Dissertation, München 1965).

⁺ Die karyometrischen und autoradiographischen Untersuchungen wurden im Zusammenhang mit einer gleichzeitig durchgeführten Arbeit von Udo LÖHRS vorgenommen.

Besprechung der Versuchsergebnisse

Die in den vorausgehenden Befunden unter b) aufgeführten Untersuchungen sollen hier an den Anfang der Besprechungen gestellt werden, da die Kenntnis der die Markierung bestimmenden Grössen bei den Asziteszellen zu einem besseren Verständnis der Markierungsveränderungen bei den subkutanen Implantaten führt.

H^3 -Thymidin steht nach der Injektion nur 40 Minuten zum Einbau in die DNS zur Verfügung (MAURER und KOBURG (47), EDWARDS (16) u.a.). Deshalb können nur die Kerne H^3 -Thymidin einbauen, die sich während dieser Zeit in der DNS-Synthesephase befinden. Dabei nehmen die Zellen entsprechend ihrer Ploidiestufen unterschiedliche Mengen von H^3 -Thymidin auf, wie KOBURG und SCHULZE (37) an Untersuchungen bei proliferierenden Systemen, wie den Epithelien des Darmes, des Ösophagus und der Kornea der Maus sowie OEHLERT und Mitarbeiter (50) bei Untersuchungen mit H^3 -Thymidin am EMAT fanden.

Somit sind die Gipfelbildungen bei den Silberkörnchenverteilungskurven der einstündig markierten Tumorasziteszellen und der subkutanen Tumoren (siehe Abb. Nr. 4-8) Ausdruck der unterschiedlichen Ploidiestufen der einzelnen Tumorzellen. Wenn auch eine genaue quantitative Bestimmung der Ploidieverhältnisse des EMAT am Autoradiogramm nicht exakt möglich ist, fällt die Übereinstimmung mit dem für den EMAT beschriebenen Chromosomensatz durch BAYREUTHER (6) auf, wobei er den Chromosomenbestand durch Chromosomenanalysen bestimmte und 93 % hyperdiploide gegenüber ca. 7 % tetraploiden Zellen fand, während im Autoradiogramm etwa 10 % tetraploide und 90 % hyperdiploide Zellen ermittelt wurden.

Ogleich bei den subkutanen Tumoren ein Vergleich mit der Ploidie der Organzellen im autoradiographischen Präparat möglich ist, zeigen die Werte für die Aszitestumorzellen in Bezug auf die Silberkörnchenzahlen keine Übereinstimmung in der Ploidiestufe mit den Organzellen. Abgesehen von den unterschiedlichen Methoden bei der Herstellung der autoradiographischen Präparate und der dadurch entstehenden quantitativen Veränderungen, ist offensichtlich das H^3 -Thymidinangebot für die Asziteszellen grösser als für die im normalen Gewebeverband liegenden Organzellen. Die Organzellen erhalten auf dem Weg der normalen Blutversorgung durch die ortständigen Kapillaren das Thymidin, und proliferierende Systeme wie Darm, Zunge und Ösophagus markieren sich mit annähernd gleicher Intensität. Durch den Aszitestumor kommt es in der Bauchhöhle des Trägartieres zu einer lokalen Entzündung, die zu einem vermehrten Serumaustritt führt. Da die Asziteszellen eine grössere Resorptionsfläche haben, ist es nicht zu erwarten, dass ein unmittelbarer Vergleich der Markierungsintensität von Tumorasziteszellen und Organzellen möglich ist. Hinzu kommt, dass im Ausstrich bei einer genügend gequetschten Asziteszelle die gesamte inkorporierte H^3 -Thymidinmenge im Autoradiogramm erfasst wird, während es sich

bei den Organen um Zellanschnitte handelt.

Somit sind die dreigipfeligen Silberkörnchenverteilungskurven Ausdruck der Polyploidie des EMAT, wobei diese mit der Tumormalignität in Zusammenhang gebracht werden kann, da die Polyploidisierung eine Reaktion der Anpassung von Zellen an ungünstige Lebensbedingungen zu sein scheint (LEVAN (42)), dabei ist es möglich, dass sich im Laufe von Generationen neue Stammlinien herausbilden können (HSU und MOORHEAD (30)).

Obgleich die Volumenkurven der Zellkerne bei gleichen Objekten einen ähnlichen Verlauf wie die Silberkörnchenverteilungskurven zeigen, lässt sich bei den vorliegenden Untersuchungen nicht genau entscheiden, ob die Volumen der Kerne auch vollständig den Ploidiestufen entsprechen. So lässt sich zum Beispiel nicht klären, ob die von HOWARD (29) an Vicia-fabe-Wurzeln beobachtete unterschiedliche Geschwindigkeit des Thymidineinbaus während der DNS-Synthese auch beim MAT vorkommt. Danach bauen die Zellen, die sich während der 40 Minuten langen Verfügbarkeitszeit des H^3 -Thymidins am Anfang oder am Ende ihrer DNS-Synthesezeit befinden, mehr Thymidin ein als die Zellen, die sich während des Thymidinangebotes in der Mitte ihrer DNS-Synthesezeit befinden. Bei He-La-Zellkulturen besteht ebenfalls keine vollständig lineare Abhängigkeit des Thymidineinbaues von der Zeit (PAINTER (51)).

Desgleichen könnte sich die von TAYLOR (61) beschriebene asynchrone Duplikation der Chromosomen beim chinesischen Hamster, sowie Chromosomenabnormitäten (TIMONEN (62)) auf das Verhältnis zwischen Volumen und Markierungsintensität auswirken.

Dass bei unseren Versuchen eine eindeutige Beziehung zwischen Kernvolumen und Grösse der DNS-Synthese, d.h. Markierungsintensität, vorhanden ist, konnte statistisch gesichert werden. Ob die von CARRIERE (10) für Leberzellen beschriebene pramitotische Kernvergrösserung durch eine der DNS-Synthese folgende RNS- und Proteinsynthese auch bei den vorliegenden Untersuchungen eine Rolle spielt, muss offen bleiben.

Durch Untersuchungen an Leberzellen von GRUNDMANN (19) ist bekannt, dass Leberzellen funktionsbedingt ihr Volumen auf das Dreifache ihres Ausgangswertes vergrössern können, ohne dass sich die Ploidiestufe dabei verändert. Bei phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen von ALTMANN (1) an tierischen Zellen haben im gleichen Medium nicht alle Kerne gleicher Ploidiestufe die gleiche Grösse auf Grund unterschiedlicher Quellungs- und Entfaltungsgrade der Chromosomen, vor allen Dingen aber bedingt durch akzessorische Substanzen, wie höhere Eiweisskörper und Ribonukleoproteide.

Eine direkte Abhängigkeit zwischen Kernvolumen und relativer Proteinmenge fanden SCHRADER und LEUCHTENBERGER (57) bei Arvelius Albopunctatus. Sie führen deshalb die Veränderungen der Kerngrösse auf den wechselnden Wasser- und Proteingehalt zurück.

Wenn auch von TIMONEN (62) für normales Endometrium und Genitalkrebs, von BUSSANY-CASPARY (9) für Leberzellen sowie von SCHAIRER (56) für Basalzellkarzinome eine Übereinstimmung von Chromosomen- und Volumengipfel angegeben werden, ist es fraglich, ob aus den hier vorliegenden Volumen- und Silberkornverteilungskurven dieser Schluss für den EMAT auch gezogen werden kann.

Wenn eine Übereinstimmung zwischen DNS-Menge und Volumen bei den Aszitestumorzellen vorhanden ist, so trifft das für die subkutanen Tumoren nur innerhalb eines bestimmten Tumorabschnittes zu. Es müssen deshalb die Zellen der Innenzonen getrennt von denen der Aussenzonen untersucht werden. Bei karyometrischen Untersuchungen (EDER, WRBA und LÖHRS (14) und LÖHRS (44)) an subkutanen Tumoren tritt bereits eine Stunde nach subkutaner Implantierung eine Differenzierung in Innen- und Aussenzone auf. Wobei die durchschnittlichen Kernvolumina in der Innenzone 287, in der Aussenzone 424 Volumeneinheiten betragen. Zu diesem Zeitpunkt haben noch alle Zellen unabhängig von ihrem Lagerungsort H^3 -Thymidin eingebaut, ohne dass die Markierungsintensität der grossen Aussenzellen dabei zunimmt.

Wie aus Abbildung 9 ersichtlich ist, markieren sich in der Innenzone eines 48 Stunden alten Implantates auch die Zellen der kleinzelligen Innenzone, wobei auch hier die grösseren Zellen markiert sind und zwar mit gleicher Intensität wie die Zellen der Aussenzone. Dabei ist zu bedenken, dass die Zellen der Innenzone ein kleineres Kernvolumen als die der Aussenzone haben. Es ist somit offensichtlich, dass bei den subkutanen Implantaten generell eine einfache Abhängigkeit zwischen Markierungsintensität und Kernvolumen nicht besteht, sondern dass hier noch andere Faktoren eine Rolle spielen.

Die erhobenen Befunde an den durch subkutane Tumorüberimpfung von 10 und 18 Tage alten MAT entstandenen Implantaten mit einstündiger H^3 -Thymidinmarkierung führten zu beträchtlichen unterschiedlichen Ergebnissen. Diese Unterschiede betreffen insbesondere das Verhalten der Zellen in den Innenzonen in Bezug auf den H^3 -Index. Dabei zeigt sich, dass bei beiden Aszitestumoren völlig gegensätzliche Befunde bestehen. Während bei dem subkutanen Implantat des 10 Tage alten MAT 48 Stunden nach der Überimpfung H^3 -Thymidin in die Innenzone diffundiert ist und auch von den Zellen inkorporiert worden ist, so dass damit die Zellen eine eindeutige Kernmarkierung zeigen, sind im Gegensatz dazu die Zellen der Innenzonen der subkutanen Implantate des 18 Tage alten MAT trotz gleicher Versuchsbedingungen nicht markiert worden, wobei zugleich eine auffallend breite Nekrosezone entwickelt ist.

Da in diesen Befunden die Aussenzonen eine deutlich topographisch abhängige Abnahme der Markierungsintensität sowohl in Bezug der Zahl der markierten Zellen, als auch in der Menge des inkorporierten H^3 -Thymidins zeigen, handelt

es sich hier offensichtlich um den Ausdruck einer ungenügenden Diffusion von H^3 -Thymidin bzw. für die Zellen der Innenzonen um fehlendes Angebot.

Diese Befunde stehen in engem Zusammenhang einerseits mit morphologischen und histochemischen Befunden über Entwicklung und zonale Gliederung während der Frühphase subkutaner Implantate, andererseits aber auch mit Befunden über das Verhalten von Tumorzellen unter Bedingungen einer "vita minima".

Bei histochemischen und morphologischen Untersuchungen (EDER und WRBA (12, 13), EDER, WRBA und LHRS (14)) zeigte sich bei subkutanen Implantaten bereits ab einer Stunde nach der Implantation eine Gliederung in eine kleinzellige Innenzone und eine grosszellige Aussenzone, wobei die Schichtdicke der Aussenzonen in der Frühphase der Implantate relativ konstant blieb (WRBA und EDER (68)).

Die Kernvolumenmessungen (LÖHRS (44)) ergaben dabei statistisch signifikante Grössenunterschiede zwischen den Zellen der Aussenzonen und denen der Innenzonen, wobei die Kernverkleinerung in den Innenzonen mit zunehmenden zeitlichen Abstand von der Implantation deutlicher wurde. Da der Übergang von den grosszelligen Aussenzonen zu den kleinzelligen Innenzonen im Bezug auf das Kernvolumen sehr scharf war, wurden deshalb für die gesamten Veränderungen Diffusionsphänomene nach Art eines Grenzsichtdickenphänomens angenommen.

Welche Stoffwechselgrössen für die Entstehung der Schichtbildung und Differenzierung in eine Innen- und Aussenzone verantwortlich sind, erscheint vorläufig offen. Wie die Befunde bei dem vorher schon näher beschriebenen Implantat eines 10 Tage alten EMAT 48 Stunden nach subkutaner Überimpfung zeigen, sind die morphologischen Differenzierungen bereits entwickelt, obwohl Thymidin in die Innenzone diffundieren kann und dort von den Zellkernen inkorporiert wird.

Wenn diese Zellen der Innenzone also noch H^3 -Thymidin aufnehmen, obwohl sie gegenüber der Aussenzone ein kleineres Kernvolumen haben, kann Thymidin nicht für die Entstehung der Veränderungen in den Innenzonen verantwortlich gemacht werden. Zugleich zeigt dieser Befund, dass Zellen im morphologischen Zustandsbild der Innenzonenveränderungen prinzipiell in der Lage sind, Thymidin aufzunehmen und in die DNS einzubauen. Kann Thymidin nicht mehr in die Innenzone gelangen, so sind die Zellen auch fähig, eine Wiederverwertung von Thymidin durchzuführen, wie die Befunde an den markiert überimpften Tumoren zeigten.

Andererseits kann aber die Diffusionsstörung so stark entwickelt sein, dass sich die Grenzsichtdicke für Thymidindiffusion schon in den innersten Anteilen der Aussenzone auswirkt, wie bei den Implantaten des 18 Tage alten EMAT. Obwohl morphologisch ein scharfer Abfall der Kerngrössen von der Aussenzone

zur Innenzone beobachtet wurde, ist der Übergang der Markierungsintensität von den stark markierten äusseren zu den nicht mehr markierten inneren Zellen der Aussenzone nicht schlagartig. Die für die Kernvolumina- und histochemischen Zytoplasmaveränderungen verantwortlichen Diffusionsstörungen sind somit offensichtlich nicht identisch mit der Diffusionsbegrenzung für Thymidin.

Für die Frage, welche Stoffwechselprozesse einer Diffusionsstörung unterliegen, geben die Untersuchungen von RAJEWSKI (54) einen Hinweis. Er fand bei autoradiographischen Untersuchungen inkubierter Marshall-Carcinomzellen von adulten Ratten, dass die Breite der DNS-Syntheszone weitgehend durch die halbe limitierende Schnittdicke bestimmt wird. Die limitierende Schnittdicke ist definiert als Schnittdicke, bei der Q_{O_2} konstant bleibt. Die Versuche von JOHNSON und BOND (34) zeigen deutlich die Abhängigkeit der Breite der DNS-Syntheszone von der O_2 -Diffusion im Gewebe. Bei Versuchen mit einem Gemisch von 95 % O_2 und 5 % CO_2 verbreiterte sich die DNS-Syntheszone bei inkubierten Tumorgewebstücken um das Doppelte.

Erreichen somit die Tumoren die limitierende Schnittdicke, so kommt es im Zentrum zu Sauerstoffmangel und damit zu Energieverlust. Die Zellen der Innenzone werden je nach Ausbildung der Schichtung des subkutanen Implantates ihr Wachstum einstellen, da die Erhaltungsenergie nur ein Fünftel der Wachstumsenergie beträgt (WARBURG (63)). Das Schicksal der kleinen Zellen in den Innenzonen der subkutanen Implantate ist somit in erster Linie vom Grad der Entwicklung und Ausbildung der Schichtung abhängig.

Wenn morphologisch eine Schichtung in Innen- und Aussenzone vorhanden, aber nicht so stark ausgebildet ist, können die kleinen Zellen der Innenzone H^3 -Thymidin aufnehmen und sich mit gleicher Intensität markieren wie die Zellen der Aussenzone, ein Zeichen dafür, dass sie noch zur DNS-Synthese fähig sind und somit wohl auch potentiell zur Zellteilung.

Ist die Schichtung dagegen extrem stark ausgebildet, kommt es schon in den frühen Entwicklungsstadien der subkutanen Implantate zur Zellnekrose. Sicher ist aber, dass die Kernverkleinerung nicht für alle Zellen eine irreversible Zellschädigung bzw. Zelltod bedeutet. Die Zellen haben dabei das Wachstum eingestellt, sind aber noch in der Lage, DNS-haltige Zelltrümer zu phagozytieren. Somit haben ein Teil der Zellen in den Innenzonen ihren Stoffwechsel den schlechten Lebensbedingungen angepasst, wobei sie zumindest in den Frühphasen der Entwicklung die Fähigkeit, echtes Wachstum zu vollbringen nicht verloren haben unter der Bedingung, dass sich die Stoffwechselsituation verbessert. So konnten WRBA und EDER (67) beweisen, dass die Innenzonenzellen noch 2-4 Tage nach subkutaner Überimpfung bei Umlagerungen ihre ursprüngliche Fermentreaktion wieder erlangen. Ebenso können die Zellen der Innenzone nach Verlagerungen wieder zur alten Grösse heranwachsen, wie LÖHRS (44) durch Lufttaschenversuche zeigen konnte. HÖRA (24) implantierte Brown-Pearce-Tu-

morzellen in "Filtersäckchen mit bekannter Porengrösse", dabei fand er Zellveränderungen, die den Veränderungen der Innenzonen entsprechen. Bei Reimplantation ging aus diesen Zellen normales Tumorwachstum hervor.

HÖRNER (25) hält solche Kleinzellen für regressive Formen von Tumorzellen. Nach Gefrierversuchen mit flüssiger Luft konnten die entstandenen Kleinzellen ein völlig normales Tumorwachstum vollbringen. BORST (7) hält deshalb die kleinen Zellen, die am Rande von Nekrosen liegen, für mögliche Dauerformen.

Das Vorhandensein von resistenten Tumorzellen, die ihre volle Wachstumstendenz behalten haben, aber durch schlechte Umweltsbedingungen in eine stationäre Phase eingetreten sind, wird auch von HAMPERL (22) für die menschliche Geschwulstpathologie angenommen.

Bereits 1905 schreibt ARNSPERGER (2) über Rezidive bei Tumorgeweben: "... wenn wir bedenken, dass nun gerade die ungünstigsten Ernährungsbedingungen in einem gefässarmen Gewebe Zellen, die eine solche hochgradige Wachstumsenergie besitzen wie die Zellen eines malignen Tumors, zu einem jahrelangen "Schlummern" verurteilen können".

Es ist somit naheliegend, dass lang überlebende Kleinzellen, so wie sie sich hier am Modell des Ehrlich-Mäuse-Aszites-Tumor in den Innenzonen entwickelt haben, auch in der menschlichen Geschwulstpathologie im Hinblick auf die Entstehung von Spätrezidiven und Spätmetastasen eine Rolle spielen.

ZUSAMMENFASSUNG

Am Ehrlich-Mäuse-Aszites-Tumor und an durch subkutane Implantation erzeugten Impfgeschwülsten wurden autoradiographische Untersuchungen zur Bestimmung der Wachstumsintensität unter Verwendung der DNS-Vorläufersubstanz H^3 -Thymidin durchgeführt.

Durch Markierung der Aszitestumorzellen vor der subkutanen Implantation wurde das Schicksal der markierten Tumorzellen verfolgt. Im subkutanen Implantat entwickelt sich bis spätestens nach 48 Stunden eine morphologische Differenzierung in eine grosszellige Aussen- und eine kleinzellige Innenzone.

Durch die Bestimmung des Verhältnisses markierter Zellen/Gesamtzellzahl (H^3 -Index) und gleichzeitiger quantitativer Auswertung der Menge des im Zellkern nachweisbaren H^3 -Thymidins konnte nachgewiesen werden, dass beim subkutanen Implantat das Wachstum von der Aussenzone ausgeht.

Autoradiographische Untersuchungen nach einstündigen Thymidinangebot zeigten an vorher nicht markierten subkutanen Implantaten eine diffusionsabhängige Verteilung der Markierung in den Aussenzonen. Morphologisch entwickelte Innenzonenzellen zeigen, wenn in der Frühphase zugeführtes Thymidin noch diffundieren kann, die Fähigkeit zur DNS-Synthese.

Während bei der Fortentwicklung der Veränderungen in den Innenzonen ein grosser Teil der Tumorzellen der Nekrose anheim fällt, können offensichtlich Tumorzellen für längere Zeit überleben. Befunde nach Vormarkierung in Aszitesform sprechen dafür, dass hierbei Zell- und Kernbestandteile nekrotischer Tumorzellen phagozytiert und wiederverwertet werden.

Durch vergleichende Silberkörnchenausählungen zwischen Tumorzellimplantaten und DNS-synthetisierenden Zellen aus Haut, Darm und Ösophagus wurden die autoradiographisch nachweisbaren Ploidiestufen des Ehrlich-Mäuse-Aszites-Tumors bestimmt.

Vergleichende karyometrische und autoradiographische Untersuchungen an Aszitestumorzellen und subkutanen Implantaten ergaben eine signifikante Abhängigkeit zwischen DNS-Synthese und Kernvolumen.

Die Untersuchungen über die Zellveränderungen im Bereich der Innenzone von subkutanen Implantaten wurden als Modell für das Leben von Tumorzellen unter schlechten Lebensbedingungen in einer *vita minima* aufgefasst und die Bedeutung für die menschliche Geschwulstpathologie erörtert.

Herrn Professor Dr. Max Eder danke ich besonders herzlich für die in jeder Hinsicht grosszügige Unterstützung und Förderung.

LITERATUR

- 1 Altmann, H.-W. und E.Grundmann:
Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen über die Vitalstruktur tierischer Zellkerne.
Beitr.path.Anat.115, 314 (1955).
- 2 Arnsperger, L.:
Über Spätrezidive maligner Tumoren.
Beitr.path.Anat. VII,Suppl. 283 (1905).
- 3 Baserga, R., S.A.Tyler, and W.E.Kisieleski:
The Kinetics of Growth of the Ehrlich Tumor.
Arch.Path.76, 9 (1963).
- 4 Baserga, R.: Mitotic Cycle of Aszites Tumor Cells.
Arch.Path.75, 156 (1963).
- 5 Bashford, E.F., J.A.Murray, W.H.Bowen:
Die experimentelle Analyse des Carcinomwachstums.
Zschr.Krebsforsch.5, 417 (1907).
- 6 Bayreuther, K.:
Der Chromosomenbestand des Ehrlich-Aszites-Tumors der Maus.
Zschr.Naturforsch.7b, 554 (1952).
- 7 Borst, M.: Kleinzellen in Tumoren. Ein Beitrag zur Frage der zellfreien Geschwulstentstehung.
Zschr.Krebsforsch.44, 145 (1936).
- 8 Büngeler, W.: Die Definition des Geschwulstbegriffes und die Abgrenzung der Hyperplasien gegenüber den Geschwülsten.
Verh.dtsch.Ges.Path.35, 10 (1952).
- 9 Bussany-Caspari, W.:
Autoradiographische Untersuchungen mit H^3 -Thymidin über die DNS-Synthese in Leberzellen verschiedener Ploidiestufen.
Frankf.Zschr.f.Path.72, 123 (1962).
- 10 Carriere, R., C.P.Leblood, and B.Messier:
Increase of the Size of Liver Cell Nuclei before Mitosis.
Exp.Cell Res.23, 625 (1961).

- 11 Diderholm, H., K.E.Fichtelius, O.Lindner:
Availability Time of H^3 -Label after Administration of
 H^3 -Thymidine in Vivo.
Exp.Cell Res.27, 431 (1962).
- 12 Eder, M. und H.Wrba:
Fermenthistochemische Untersuchungen zur Biologie von
Aszitestumoren und ihrer Umwandlungen in solide Ge-
schwülste.
Zschr.Krebsforsch.64, 353 (1961).
- 13 Eder, M. und H.Wrba:
Veränderungen der Kerngrößen und der DNS-Synthese bei
der Entwicklung solider Geschwülste aus Aszitestumorzel-
len.
Zschr.Krebsforsch.65, 309 (1963).
- 14 Eder, M., H.Wrba, und U.Löhrs:
Topographisch abhängige Kerngrößenveränderungen in der
Frühphase von Implantationstumoren.
Naturwissensch.49, 450 (1962).
- 15 Eder, M., H.Wrba und H.H.Muth:
Autoradiographische Untersuchungen zum Nukleinsäure-
Stoffwechsel bei der Umwandlung von Aszitestumoren.
Naturwissensch.52, 46 (1963).
- 16 Edwards, J.L., A.L.Koch, P.Youcis, H.L.Freese, M.B.Laite and
J.Th.Donalson:
Some Characteristics of DNA Synthesis and the Mitotic
Cycle in Ehrlich Ascites Tumor Cells.
J.Biophys.Biochem.Cytol.7, 273 (1960).
- 17 Gall, J.G. and W.W.Johnson:
Is there "Metabolic" DNA in the Mouse Seminal Vasicle?
J.Biophys.Biochem.Cytol.7, 657 (1960).
- 18 Graham, G.S.: The Cancer Cells of Serous Effusions.
Amer.J.Path.9, 701 (1933).
- 19 Grundmann, E.: Beiträge zur Krebsentstehung in der Rattenleber an Hand
mikrophotometrischer Messungen.
Verh.dtsch.Ges.Path.19, 362 (1955).

- 20 Habers, E.: Autoradiographie als histologisch-chemisches Untersuchungsverfahren.
Handbuch der Histochemie I/1, 406 (1958).
Gustav-Fischer-Verlag 1958.
- 21 Hamperl, H.: Handbuch Allgem. Pathol. VI/3, 18 (1956).
- 22 Hamperl, H.: Über die Gutartigkeit und Bösartigkeit von Geschwülsten.
Verh. dtsh. Ges. Path. 35, 29 (1952).
- 23 Hintzsche, E.: Statistische Probleme aus der Kerngrössenforschung.
Experimentia I/4, 103 (1945).
- 24 Höra, J.: Untersuchungen über das Schicksal der Borstischen Kleinzellen im Brown-Pearce-Tumor.
Zschr. Krebsforsch. 52, 1 (1942).
- 25 Hörner, O.: Experimenteller Beitrag zur Frage der Kleinzellen in Tumoren.
Zschr. Krebsforsch. 51, 365 (1941).
- 26 Hörner, O.: Lückenlose Serienuntersuchungen am transplantierten Mäusekrebs.
Zschr. Krebsforsch. 43, 377 (1936).
- 27 Homann, W.: Zur Biologie des Mäuseaszitescarcinoms.
Zschr. Krebsforsch. 58, 511 (1952).
- 28 Hornsey, S. and A. Howard:
Autoradiographic Studies with Mouse-Ehrlich-Ascites-Tumor.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 63, 915 (1956).
- 29 Howard, A. and D. L. Dewey:
Non-Uniformity of Labelling Rate during DNA-Synthesis.
Exp. Cell Res. 24, 624 (1961).
- 30 Hsu, T. C. and P. S. Moorhead:
Mammalian Chromosomes in Vitro.
J. Nat. Cancer Inst. 18, 463 (1957).
- 31 Hughes, W. C.:
Autoradiography with Tritium: The duplicating Mechanism of Chromosomes and the Chronology of Events Related to Nucleic Acid Synthesis.
Peaceful Uses of Atomic Energy. Proc. Sec. Int. Conf. Geneva 1958. 25, 203 (1958).

- 32 Huth, E.F.: Über die Entstehung von Riesenzellen beim Mäuseascitescarcinom.
Zschr.Krebsforsch.58, 218 (1952).
- 33 Huth, E.F.: Über den unbeeinflussbaren Ablauf des Mäuseascitescarcinoms.
Zschr.Krebsforsch.59, 230 (1953).
- 34 Johnson, H.A. and V.P.Bond:
A Method of Labelling Tissues with Tritiated Thymidine in Vitro and its Use in Comparing Rates of Cell Proliferation in Duct Epithelium, Fibroadenoma and Carcinoma of Human Breast.
Cancer 14, 639 (1961).
- 35 Klein, G.: Comparative Studies of Mouse Tumors with Respect to their Capacity for Growth as "Ascites Tumors" and their Average Nucleic Acid Content per Cell.
Exp.Cell Res.2, 518 (1951).
- 36 Koburg, E.: Autoradiographische Untersuchungen zum Nukleinsäurestoffwechsel einzelner Zellarten der Lunge.
Verh.dtsch.Ges.Path.44, 160 (1960).
- 37 Koburg, E. und Schulze:
Autoradiographische Untersuchungen mit H^3 -Thymidin über die Dauer der DNS-Synthese, der Ruhephase und der Mitose bei proliferierenden Systemen wie den Epithelien des Darmes, des Ösophagus und der Cornea der Maus.
Verh.dtsch.Ges.Path.45, 103 (1961).
- 38 Koburg, E. und W.Maurer:
Autoradiographische Untersuchungen mit H^3 -Thymidin über die Dauer der DNS-Synthese und ihren zeitlichen Ablauf bei den Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus.
Biochem.Biophys.Acta 61, 229 (1962).
- 39 Lennartz, K.J., W.Maurer und N.Schümmelfelder:
Die DNS Verdopplungszeit und Generationsdauer beim Ehrlich Aszites Tumor der Maus.
Verh.dtsch.Ges.Path.48, 280 (1964).

- 40 Lettré, H., F.K.Hemprich und B.Spirig:
Über das Verhalten von Bestandteilen von Tumorzellen bei
den Transplantaten.
Zschr.Krebsforsch.,59, 64 (1953).
- 41 Lettré, H., H.Wrba und E.Seidler:
Über das Verhalten von Bestandteilen bei den Transplanta-
ten von Tumorzellen. XI.Mitteilung.
Zschr.Krebsforsch.,60, 294 (1955).
- 42 Levan, A.: Chromosomes in Cancer Tissues.
Ann.N.Y.Acad.Sci.,63, 774 (1956).
- 43 Levan, A. und T.S.Hauschka:
Endomitotic Reduplication Mechanisms in Ascites Tumors
of Mouses.
J.Nat.Cancer Inst.,14, 1 (1953).
- 44 Löhrs, U.: Karyometrische und autoradiographische Untersuchungen
am Ehrlich-Mäuse-Aszites-Tumor.
Inaug.Diss.München 1965.
- 45 Makino, S. und K.Koyoko:
Cytological Studies of Tumors.IX.Characteristic Chromo-
some Individuality in Tumor Strain Cells in Ascites Tumors
of Rats.
J.Nat.Cancer Inst.,13, 1213 (1953).
- 46 Maurer, W. und E.Primbsch:
Grösse der beta-Selbstabsorption bei der H^3 -Autoradiographie.
Exp.Cell Res.,33, 8 (1964).
- 47 Maurer, W. und E.Koburg:
Autoradiographische Untersuchungen über den zeitlichen
Verlauf der DNS-Synthese bei den Epithelien des Darms
und bei anderen Zellarten der Maus.
Verh.dtsch.Ges.Path.,45, 108 (1961).
- 48 Norris, W.P. and L.A.Woodruff:
The Fundamentals of Radioautography.
Ann.Rev.Nucl.Sci.,5, 297 (1955).
- 49 Oehlert, W., P.Nettesheim und R.Machemer:
Die Anwendung flüssiger Emulsionen bei autoradiographi-
schen Untersuchungen mit H^3 -markierten Substanzen.
Histochemie 3, 99 (1962).

- 50 Oehlert, W., N. Seemayer und P. Lauf:
 Autoradiographische Untersuchungen über den Generations-
 zyclus der Zellen des Ehrlich-Ascitescarcinoms der weis-
 sen Maus.
 Beitr. path. Anat. 127, 63 (1962).
- 51 Painter, R.B., R.M. Drew and B.G. Giaque:
 Further Studies on Desoxyribonucleic Acid Metabolism in
 Mammalian Cell Cultures.
 Exp. Cell Res. 21, 98 (1960).
- 52 Peters, J.E., H. Seipelt und E. Matthias:
 Über den Einfluss des Lichtes auf die Mitoserhythmi-
 k des EAT.
 Arch. Geschwulstforsch. 23, 1 (1964).
- 53 Probst, A.:
 Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Differen-
 zierung und Degeneration des Aszitestumors.
 Beitr. path. Anat. 127, 49 (1962).
- 54 Rajewski, M.F.: Thymidininkorporation und O₂ Konzentration in Explan-
 taten und malignen Geweben "in vitro".
 Naturwissenschaften 52, 341 (1965).
- 55 Ryser, H., J.B. Caulfield und J.C. Aub:
 Studies on Protein Uptake by isolated Tumor Cells.
 J. of Cell Biol. 14, 255 (1962).
- 56 Schairer, E.:
 Kernmessungen und Chromosomenzählungen an mensch-
 lichen Geschwülsten.
 Zschr. Krebsforsch. 43, 1 (1936).
- 57 Schrader, F. und C. Leuchtenberger:
 A Cytochemical Analysis of the Functional Interrelations of
 Various Cell Structures in Arvelius Albopunctatus (De
 Geer).
 Exp. Cell. Res. 1, 421 (1950).
- 58 Seeger, P.G.:
 Untersuchungen am Tumoraszites der Maus.
 Arch. exp. Zellforsch. 20, 280 (1937).
- 59 Stöcker, E.:
 Zur Frage der funktionellen und pathologischen Kernschwel-
 lung. Autoradiographische Untersuchungen mit H³-Phenyl-
 alanin und H³-Cydidin an der Rattenleber nach Thiocet-
 amid.
 Naturwissenschaften 50, 130 (1963).

- 60 Stöcker, E. und W.D.Heine:
Über die Proliferation von Nieren- und Leberepithel unter normalen und pathologischen Bedingungen.
Autoradiographische Untersuchungen mit H^3 -Thymidin an der Ratte.
Beitr.path.Anat.131, 410 (1965).
- 61 Taylor, J.H.: Asynchronous Duplication of Chromosomes in Cultured Cells of Chinese Hamster.
J.Biophys.Biochem.Cytol.7, 455 (1960).
- 62 Timonen, S.: Mitosis in Normal Endometrium and Genital Cancer.
Diss. in Acta obstetr.Scand.31/2, 1 (1950).
- 63 Warburg, O.: Über die Entstehung der Krebszellen.
Naturwissenschaften 42, 401 (1955).
- 64 Warburg, O., F.Wind und E.Negelein:
Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper.
Klin.Wschr.5, 829 (1926).
- 65 Wimber, D.E., H.Quastler und O.L.Stein:
Analysis of Tritium Incorporation into Individual Cells by Autoradiographie of Squash Preparations.
J.Biophys.Biochem.Cytol.8, 327 (1960).
- 66 Wrba, H.: Die Wirkung von Glukose auf die Aufnahme von hochmolekularen Partikeln durch Tumorzellen in vitro.
Zschr.Krebsforsch.63, 415 (1960).
- 67 Wrba, H. und M.Eder:
Zur Frage der Induktion von Zelldifferenzierung bei der Frühphase der Umwandlung von Aszitesgeschwulst in solide Tumoren.
Zschr.Krebsforsch.65, 154 (1962).
- 68 Wrba, H. und M.Eder:
Induktion von Zelldifferenzierung und Fermentaktivität bei der Umwandlung von Aszites-Tumoren in solide Geschwülste.
Naturwissenschaften 40, 305 (1962).
- 69 Wrba, H. und G.Giessler:
Die Beziehungen zwischen Glukosekonzentration und Verwertung grosser Moleküle durch Tumorzellen.
Zschr.Krebsforsch.65, 250 (1963).

LEBENS LAUF

Am 2. Mai 1939 wurde ich als Sohn des Facharztes für Hals, Nase und Ohren Dr. med. Kurth Muth und seiner Ehefrau Ingeborg, geb. Marcus, in Saalfeld/Saale geboren.

In Saalfeld besuchte ich die Volksschule und anschliessend die Otto-Ludwig-Oberschule, wo ich 1957 die Reifeprüfung ablegte.

Nach Bestehen der Sonderreifeprüfung 1958 in Erlangen, begann ich im Wintersemester 1958/59 an der Universität Erlangen Medizin zu studieren. Hier legte ich 1959 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und 1961 die ärztliche Vorprüfung ab. Vom 2. klinischen Semester an studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und bestand im August 1964 nach 11 Semestern das medizinische Staatsexamen.

Vom Oktober 1964 bis Juli 1965 arbeitete ich als Medizinalassistent am Pathologischen Institut der Universität München.

